

Versuche zur enzymatischen
und chemischen Synthese
biologisch aktiver Mevalonsäure

von

DIETER DÜTTING

München 1960

Versuche zur enzymatischen und chemischen Synthese
biologisch aktiver Mevalonsäure

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Dieter Dütting
aus
Essen
Dezember 1960



Berichterstatter: Prof. Dr. F. L y n e n

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1960

Meinen Eltern und Beate
in Dankbarkeit zugeeignet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1957 bis September 1960 am Max Planck-Institut für Zellchemie in München ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. F. L y n e n ,

danke ich herzlich für die vielen wertvollen Anregungen und sein grosses Interesse an meiner Arbeit.

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

=====

	Seite
A Einführung	1
B Ergebnisse	6
I. Enzymatische Synthese biologisch aktiver Mevalonsäure aus ($\pm$)- β -Hydroxy- β -methyl- -glutaraldehydsäure	6
II. Versuche zur Konfigurationsumkehr optisch aktiver Mevalonsäure	22
Diskussion der Hydrolyse-Versuche	27
IR-spektroskopische Untersuchungen	34
Synthese von β -Hydroxy- β -methyl- -valeriansäurebenzhydrylamid	55
Reduktion von Mevalonsäurelacton	57
III. Synthese von Δ^3 -Isopentenol	63
IV. Zusammenfassung	68
C Experimenteller Teil	72
I. Enzymatische Synthese biologisch aktiver Mevalonsäure aus ($\pm$)- β -Hydroxy- β -methyl- -glutaraldehydsäure	72
1. Teste	72
a) 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Test	72
b) Hydroxamsäure-Test	72
c) Mevalonatkinase-Test	73
d) Aldehydsäure-Reduktions-Test	74

	Seite
2. Ausgangsmaterial	75
a) ($\pm$)- β -Hydroxy- β -methyl-glutaraldehydsäure	75
b) Herstellung der Hefepräparate	76
c) Untersuchung eines <i>Escherichia coli</i> -Präparates auf Mevalonsäuredehydrogenase-Aktivität	78
d) Reinigung der Mevalonatkinase aus Hefe	78
3. Trennung von Mevalonsäure und Aldehydsäure an Dowex 1	83
4. Trennung von Mevalonsäure und Aldehydsäure an saurem Celite	84
5. Trennung von Mevalonsäurelacton und Aldehydsäure durch Hochspannungselektrophorese	87
6. Enzymatische Synthese von Mevalonsäure. Präparative Ansätze	88
a) Inkubation	88
b) Chromatographische Reinigung der Mevalonat-Extrakte	88
c) Kristallisation der Mevalonsäure als Dibenzyläthylendiammoniumsalz	90
d) Enzymatische Phosphorylierung von enzymatisch und synthetisch hergestellter Mevalonsäure	91
e) Hydroxamsäure-Test	92
f) UV-Absorptionsspektren	93
g) Hochspannungs-papierelektrophorese	93
h) Identifizierung des in der isolierten Mevalonsäure enthaltenen enzymatisch inaktiven sauren Bestandteils als (-)-Mevalonsäure	94
7. Kinetik der Aldehydsäure-Reduktion	96

	Seite
II. Versuche zur Konfigurationsumkehr optisch aktiver Mevalonsäure	101
1. Mevalonsäurebenzhydrylamid	101
2. 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydrylamid	103
3. 5-O-Trityl-mevalonsäurebenzhydrylamid	103
4. 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamid	104
5. β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamid	105
a) β -Hydroxy- β -methylvaleriansäuremethylester	105
b) β -Hydroxy- β -methylvaleriansäure	106
c) β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid	107
6. Kinetik der alkalischen Verseifung von Mevalonsäurebenzhydrylamid	108
7. Saure und alkalische Hydrolyse von 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydrylamid	110
8. Saure und alkalische Hydrolyse von 5-O-Trityl-mevalonsäurebenzhydrylamid	113
9. Saure und alkalische Hydrolyse von 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamid	114
10. Alkalische Hydrolyse von β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid	116
11. Infrarot-Spektren	117

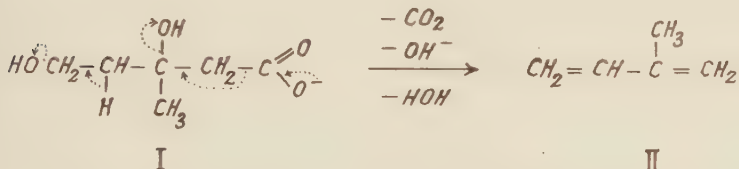
	Seite
12. Versuch zur Herstellung von Mevalon- säure-dimethylamid	120
13. Hemiacetal (XXXV)	121
14. Kinetik der 2,4-Dinitrophenylhydrazon- bildung aus Hemiacetal	122
15. Ketalisierungsversuch	123
III. Synthese von Δ^3 -Isopentenol	124
a) 1-Tetrahydropyranyl-3-butanon	124
b) Triphenylmethylphosphoniumbromid	124
c) 1-Tetrahydropyranyl-3-methyl-3-buten	124
d) Δ^3 -Isopentenol	126
e) 3,5-Dinitrobenzoat von Δ^3 -Isopentenol	126
Literaturverzeichnis	128

Abkürzungen

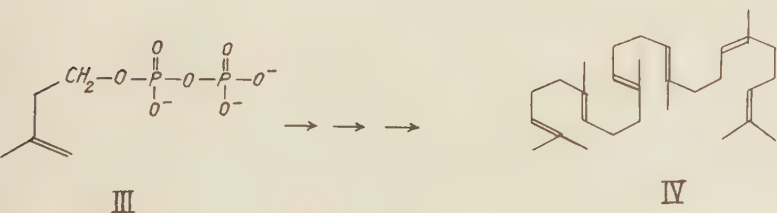
ADP, ATP	Adenosindiphosphat bzw. -triphosphat
CoA, CoA-SH	Coenzym A
DPN und DPNH	oxydiertes und reduziertes Diphospho- pyridinnukleotid
TPN und TPNH	oxydiertes und reduziertes Triphospho- pyridinnukleotid
MVS	Mevalonsäure
DBÄD-MVS	N,N'-Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat
HMGas, Aldehydsäure	β -Hydroxy- β -methylglutaraldehydsäure
Trispuffer	Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan- Puffer
TRAM/HCl	Triäthanolamin-HCl-Puffer
RG	Reaktionsgeschwindigkeit
UZ	Übergangszustand
ZP	Zwischenprodukt
λ	Wellenlänge
$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$	Wellenzahl $[\text{cm}^{-1}]$
$\Delta E = \log \frac{I_0}{I}$	optische Dichte, Extinktion
$\epsilon = \frac{\Delta E}{c \cdot l}$	molarer Extinktionskoeffizient $\left[\frac{\text{Liter}}{\text{Mol. cm}} \right]$

Einführung

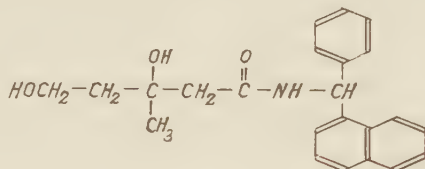
Mit der Entdeckung der 3,5-Dihydroxy-3-methyl-valeriansäure (Mevalonsäure) als Wachsfaktor für *Lactobacillus acidophilus* und Vorläufer des Squalens in der Terpen- und Steroidbiosynthese durch den Arbeitskreis um K. Folkers (1, 2, 3) wurde der Weg zur Erforschung der einzelnen Teilschritte der Squalen-Biogenese freigelegt. Wie die Strukturformel der Mevalonsäure (I) zeigt, muss diese Verbindung dem von L. Ruzicka (4, 5) postulierten "aktiven Isopren", an dem die Kohlenstoffgerüste der Terpene und Steroide durch Kondensation abgeleitet werden können, sehr nahe stehen, kann man doch durch eine kombinierte Decarboxylierung-Eliminierungsreaktion und Dehydratisierung theoretisch Mevalonsäure in Isopren (II) überführen:



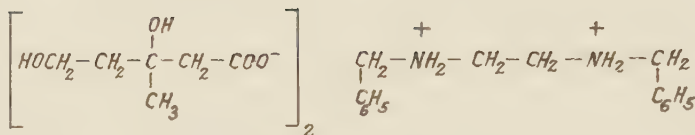
Die Arbeiten von Lynen (6), Bloch (7) und Mitarbeitern zeigten, dass in diesen einfach erscheinenden Weg in der lebenden Zelle eine Reihe von Phosphorylierungsschritten eingeschaltet sind, die zu Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphat (III) führen, das als "aktive Isopreneinheit" an der eigentlichen Kondensationsreaktion zum Squalen (IV) beteiligt ist:



Über das kristalline α -Phenyl-1-naphthalin-methylamid (V) gelang der Folkers-Gruppe die Spaltung synthetisch bereiteter racemischer Mevalonsäure (8) in ihre Enantiomeren, von denen sich das rechts-drehende als die im *Lactobacillus acidophilus*-Test allein aktive Form der Mevalonsäure erwies. Der Drehwert (V) wurde zu $[\alpha]_D^{25} = +29^\circ$ ($c = 1,1$ in CHCl_3) bestimmt, seine alkalische Hydrolyse lieferte (+)-Mevalonsäure, die als N,N'-Dibenzyläthylen-diammonium-salz (VI) isoliert werden konnte.



V



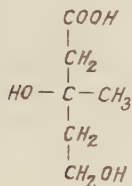
VI

D. Arigoni (9) gelang die Aufklärung der absoluten Konfiguration der Mevalonsäure durch experimentelle Verknüpfung mit Chinasäure und damit auch dem Bezugsstandard (R)-(+)-Glycerinaldehyd ¹⁾. Auf Grund dieser Arbeit muss der unnatürlichen (-)-Mevalonsäure ²⁾ die

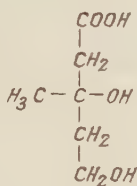
¹⁾ Konfigurative Bezeichnung nach R.S. Cahn, C.K. Ingold und V. Prelog, *Experientia* **12**, 81 (1956).

²⁾ Das aus Chinasäure bereitete unnatürliche (S)-Mevalolacton zeigte einen positiven Drehwert (M. Eberle und D. Arigoni, *Helv.chim.Acta* **43**, 1508 [1960]), während unnatürliche (S)-Mevalonsäure nach Lynen und Grassl (19) negativ dreht.

(S)-Konfiguration (VII), der natürlichen (+)-Mevalonsäure die (R)-Konfiguration (VIII) zugeschrieben werden:

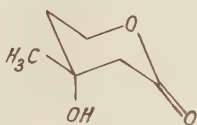


VII

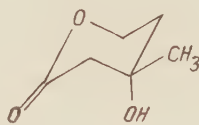


VIII

Wie alle δ -Hydroxycarbonsäuren geht freie Mevalonsäure spontan ins stabile Sechsring-Lacton über, dessen enantiomere Sessel-Konformationen (IX) und (X) zeigen:



IX

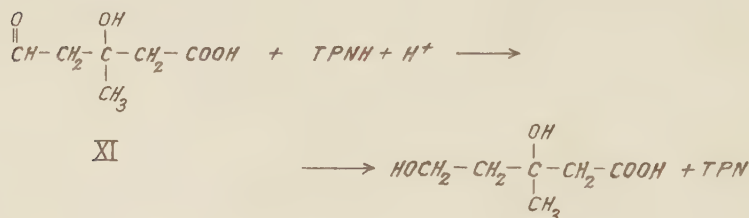


X

Betrachtet man das IR-Spektrum von synthetischem (+)-Mevalonsäure-lacton (Abb. 13), so fällt die intensive Carbonyl-Absorption bei $5,84\mu$ und die stark ausgeprägte OH-Valenzschwingung bei $2,94\mu$ auf, die nicht allein der tertiären Hydroxylgruppe zugeordnet werden kann. Das Spektrum ist charakteristisch für ein Gleichgewichtsgemisch von offener δ -Hydroxycarbonsäure und Lacton, wobei das Lacton, wie auch aus der Titrationskurve hervorgeht (33), im Gleichgewicht vorherrscht.

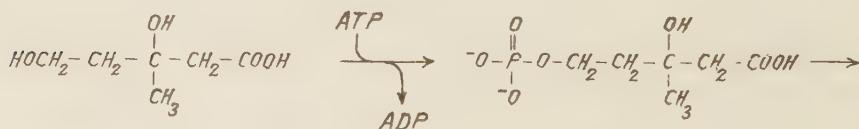
Innerhalb der Untersuchungen über die Biosynthese der Mevalonsäure aus Acetyl-CoA (10,11,12) und der Biosynthese des Squalens aus Mevalonsäure (13,14) versuchten wir ein Verfahren zur rationellen Gewinnung natürlicher (+)-Mevalonsäure zu entwickeln. Zu diesem Zweck boten sich drei Möglichkeiten:

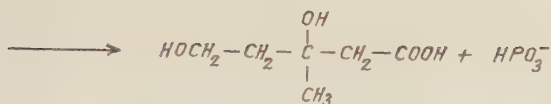
- 1) Die enzymatische Reduktion synthetischer $(\pm)$ - β -Hydroxy- β -methyl-glutaraldehydsäure (XI), die nach Versuchen von Knappe und Lynen (15) in Hefezellen durch eine TPNH-spezifische Dehydrogenase katalysiert wird:



Wegen der Instabilität dieses Enzyms in zellfreien Extrakten, die eine nur 9-fache Anreicherung aus Bäckerhefe erlaubte, mussten wir uns bei dieser Methode auf die Verwendung von Hefepreparaten beschränken, die durch mehrmaliges Einfrieren der Hefe in flüssiger Luft und Auswaschen der aufgetauten Zellen mit verdünnter KCl-Lösung erhalten wurden. Eine in seiner Coenzym-Spezifität vom Hefe-Enzym verschiedene Mevalonsäure-Dehydrogenase konnte Schlesinger (16) aus Schweineleberextrakten etwa 30-fach anreichern.

- 2) Die enzymatische Phosphorylierung synthetischer $(\pm)$ -Mevalonsäure mittels der von U. Henning (17) sowie T.T. Tchen (18) in Hefe entdeckten Mevalonatkinase, die spezifisch nur $(+)$ -Mevalonsäure in 5-Phosphomevalonsäure (XII) überführt, das sich durch Inkubation mit Phosphatase in $(+)$ -Mevalonsäure und Orthosphosphat spalten lässt:





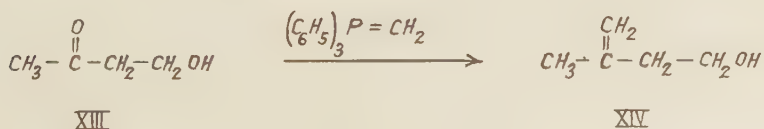
- (3) Die chemische Umwandlung der durch bakterielle Racematspaltung von Lynen und Grassl (19) dargestellten (S) (-)-Mevalonsäure in (R) (+)-Mevalonsäure:



Diese Methode, die auf eine Konfigurationsumkehr am asymmetrischen C-Atom hinausläuft, machte die Entwicklung eines präparativen Verfahrens notwendig, mit dem das Hydroxylende des Moleküls unter Schutz des Asymmetriezentrums oxydiert, das Carboxylende reduziert werden kann.

Da die zweite Methode wegen der benötigten grossen ATP-Menge für präparative Ansätze zu kostspielig ist, beschränkten wir unsere Versuche auf die erste und dritte Methode.

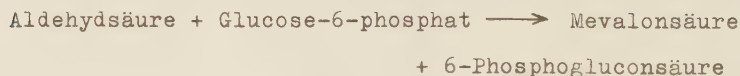
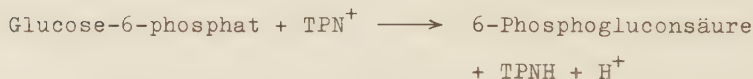
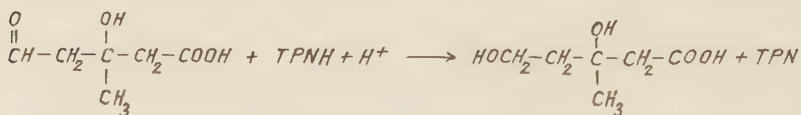
Neben diesen Versuchen zur Synthese biologisch aktiver Mevalonsäure arbeiteten wir eine Synthese von Δ^3 -Isopentenol (3-Methyl-3-buten-1-ol) aus, das als Pyrophosphatester bei der Squalenbiogenese die Rolle des "aktiven Isoprens" spielt. Hier lag eine interessante Anwendungsmöglichkeit der Wittig-Schöllkopf-Methode (20) auf der Hand, d.h. eine direkte Umwandlung der Carbonylgruppe des 3-Ketobutanols (XIII) in die endständige Methylengruppe des Δ^3 -Isopentenols (XIV) mittels Triphenylphosphinmethylen:



Ergebnisse

I. Enzymatische Synthese biologisch aktiver Mevalonsäure aus (+)- β -Hydroxy- β -methylglutaraldehydsäure

Als Ausgangsmaterial diente eine nach dem Verfahren von Eggerer und Lynen (21) hergestellte racemische β -Hydroxy- β -methylglutaraldehydsäure (im folgenden einfach Aldehydsäure genannt), die in neutraler wässriger Lösung einige Zeit eingefroren aufbewahrt werden kann, in den meisten Fällen aber vor Gebrauch frisch dargestellt wurde. Inkubiert man diese Verbindung mit plasmolysierten Hefezellen, die durch wiederholtes Einfrieren in flüssiger Luft und Auswaschen niedermolekularer Bestandteile (Metalle, Nukleotid-Coenzyme) mit KCl-Lösung erhalten wurden (22), und einem TPNH-liefernden System (Glucose-6-phosphat + TPN), so wird die Aldehydsäure zu Mevalonsäure reduziert, die durch chromatographische Reinigungsmethoden aus dem Reaktionsansatz isoliert werden kann:



Orientierende kinetische Versuche, in denen die Abnahme der Aldehydkonzentration mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Test von Friedemann und Haugen (22) bestimmt wurde, zeigten, dass 50 % der Aldehydsäure nach 20 Min. verbraucht worden sind. Bei Annahme eines stereospezifischen Reaktionsverlaufes, d.h. der Entstehung reiner (+)-Mevalonsäure aus racemischer Aldehydsäure, schien daher eine Inkubationszeit von 30 Min. für die vollständige Reduktion zu genügen. Zur Abtrennung der im ent-

eiweissten Inkubationsansatz enthaltenen, nicht umgesetzten (-)-Aldehydsäure sowie anderer löslicher Bestandteile vom entstandenen Mevalonat kombinierten wir zwei chromatographische Reinigungsverfahren miteinander, die in Vorversuchen mit reinen Mevalonsäure-Aldehydsäure-Gemischen gute Trenneffekte zeigten: die Chromatographie am Anionenaustauscher Dowex 1 und die Chromatographie an saurem Celite. Die Trennung von Mevalonsäure und Aldehydsäure an Dowex 1, das in der HCOO^- oder Cl^- -Form verwendet wurde, beruht auf dem Doppelcharakter der Mevalonsäure, die in schwach saurer wässriger Lösung als Lacton vorliegt und nicht vom Austauscher festgehalten wird. Bei der Elution mit destill. H_2O in der Kälte wird das Lacton quantitativ von der Säule gewaschen, während die Aldehydsäure haften bleibt und mit $\frac{M}{100}$ HCOOH oder HCl eluiert werden kann (Abb. 1 und 2).

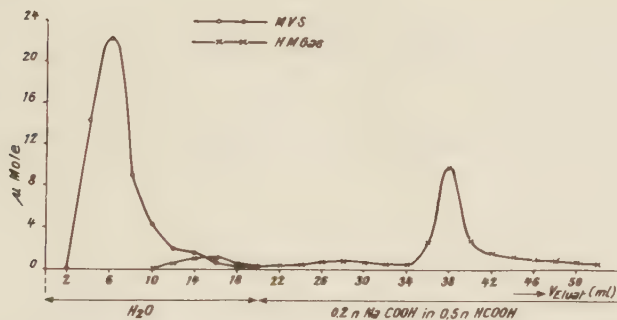


Abb. 1 Trennung von MVS-Lacton ($50 \mu\text{M}$) und HM Gas ($30 \mu\text{M}$) an Dowex 1 (HCOO^-), 200-400 mesh, $1,0 \times 9,5 \text{ cm}$

Zur Mevalonsäure-Bestimmung verwendeten wir in diesen Versuchen ihre kolorimetrische Bestimmung als Hydroxamsäure nach Lynen und Grassl (19), zur Bestimmung der Aldehydsäure die 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Bildung. Die Anwendung dieser Methode auf ein Mevalonsäure-Aldehydsäure-Gemisch, das aus einem Hefe-Inkubationsansatz

nach Denaturieren und Abzentrifugieren des Proteins gewonnen worden war, liess jedoch eine schlechte Trennung erkennen, vermutlich wegen Überladung der Säule mit Phosphorsäureestern.

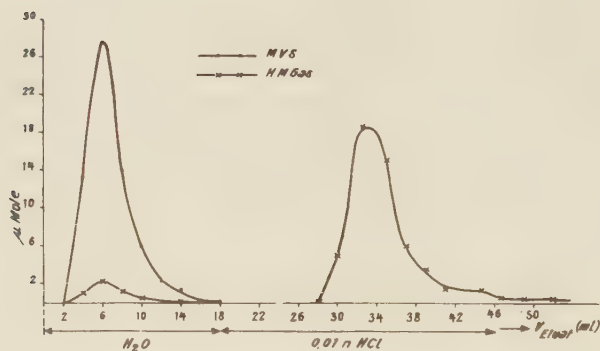


Abb. 2 Trennung von MVS-Lacton (50, μ M) und HM 6.96 (50, μ M) an Dowex 1 (Cl⁻), 200-400 mesh, 2,0 x 11,5 cm

Wir versuchten daher mit der von Swim und Krampitz (23) für die Trennung der Komponenten des Citronensäure-Cyclus eingeführten Celite-Chromatographie zum Ziel zu kommen. Eluiert man nach Auftragen des Mevalonsäure-Aldehydsäure-Gemisches mit schwefelsaurem CHCl_3 , so werden beide Verbindungen gleichzeitig von der Säule gewaschen. Reines schwefelsaures Benzol zeigte dagegen keinen Elutionseffekt. Die Trennung der Säuren gelang schliesslich durch Elution mit einem Benzol- CHCl_3 -Gemisch (9 : 1), das nur die Mevalonsäure von der Säule holt, während Aldehydsäure erst bei höheren CHCl_3 -Konzentrationen langsam und sehr verwaschen eluiert wird, was für eine chemische Veränderung dieser gegenüber Säuren sehr empfindlichen Substanz im schwefelsauren Celite spricht.

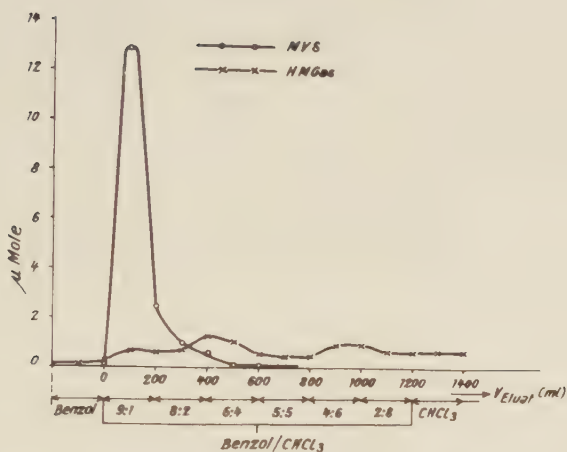


Abb. 3 Trennung eines Gemisches von 20 μ Mol MVS und 10 μ M HMGCoA an saurem Elute

Wie Eggerer fand (21), erfolgt im sauren Milieu ausserordentlich leicht Dehydratisierung zur β -Methylglutaconaldehydsäure und anschliessend Decarboxylierung zum β, β -Dimethylacrolein. Zur Mevalonsäurebestimmung in den Eluatien der Celite-Chromatographie eignet sich die relativ unempfindliche Hydroxamsäure-Methode nicht (Erfassungsgrenze ca. 1 μ M Mevalonsäurelacton). Wir suchten daher nach einer neuen empfindlicheren Bestimmungsmethode und werteten die enzymatische Phosphorylierung von (+)-Mevalonat durch die Mevalonatkinase aus, die bereits von U. Henning zur quantitativen Mevalonsäurebestimmung herangezogen worden war (11). Die Anreicherung der Mevalonatkinase aus Bäckerhefe (24) und die Ausführung des Testes werden im Versuchsteil beschrieben.

Man kann schliesslich auch papierelektrophoretisch im Pherographen nach Wieland und Pfeleiderer das ungeladene Mevalonsäurelacton von der Aldehydsäure abtrennen. Für Versuche im präparativen Maßstab ist dieses Verfahren nicht sehr geeignet. Die später beschriebenen kinetischen Messungen der Aldehydsäure-Reduktion machten die

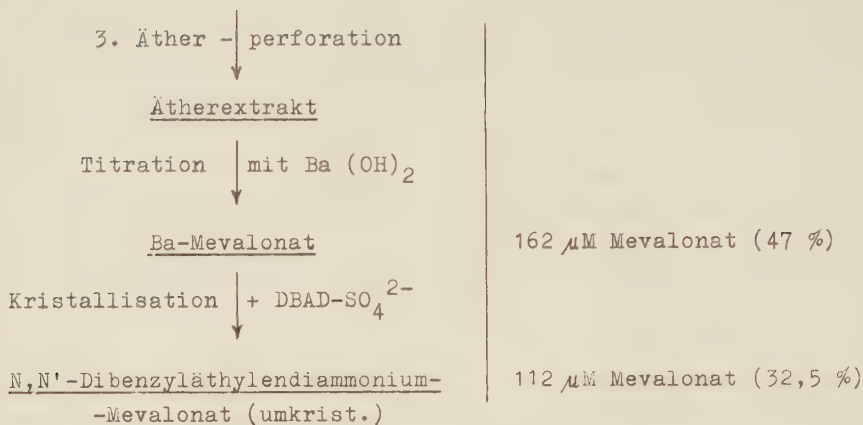
Verwendung zellfreier Enzymlösungen mit Mevalonsäuredehydrogenase-Aktivität wegen ihrer grösseren Einheitlichkeit und der damit zusammenhängenden besseren Reproduzierbarkeit der Messungen erforderlich. Wir versuchten deshalb die Mevalonsäure-Dehydrogenase durch verschiedene Aufschlussverfahren in Lösung zu bringen. Als Enzymtest diente uns dabei eine Kombination der Mevalonsäuredehydrogenase-Reaktion mit der Mevalonatkinase-Reaktion (Aldehydsäure-Reduktionstest). Die aus eingesetzter ($^{+}$)-Aldehydsäure durch die zu testende Enzymlösung mittels TPNH gebildete Mevalonsäure wird aus dem angesäuerten Reaktionsansatz mit Äther extrahiert und dann mit Mevalonatkinase enzymatisch bestimmt.

Für den Aufschluss der Hefezellen kamen drei Methoden in Betracht:

- (1) Autolyse mit Toluol nach der Methode von Kunitz (25). Dieses Verfahren wurde von Knappe (15) zur Anreicherung der Mevalonsäure-Dehydrogenase verwendet und führte zu keinen stabilen Enzympräparaten.
 - (2) Wiederholtes Einfrieren ausgewaschener Bäckerhefe in flüssiger Luft und mehrstündiges Schütteln der verflüssigten Hefe bei 37° nach Zusatz von festem KCl. Auf diese Weise gelang es Steyn-Parvé (26), die Thiaminokinase in Lösung zu bringen. Wir konnten mit dieser Methode jedoch kein aktives Mevalonsäuredehydrogenase-Präparat herstellen.
 - (3) Aufschluss der mit flüssiger Luft plasmolysierten und mit KCl ausgewaschenen Hefezellen im Schlossmann-Zellhomogenisator (27) und Ammonsulfatfällung der in Lösung gegangenen Enzymproteine. Die auf diese Weise gewonnenen Enzymlösungen waren im optischen Test auf Mevalonsäuredehydrogenase (11) aktiv und wurden für die kinetischen Messungen verwendet. Sie boten aber gegenüber den plasmolysierten Hefezellen keinen Vorteil bei den präparativen Ansätzen.
- Ein Versuch, die Mevalonsäure-Dehydrogenase in *Escherichia coli* B nach Aufschluss der Zellen im Schlossmann-Homogenisator nachzuweisen, fiel negativ aus.

Für die Gewinnung optisch aktiver Mevalonsäure aus Inkubationsansätzen mit "gefrorener Hefe" erwies sich auf Grund der in den Vorversuchen gemachten Erfahrungen folgender Reinigungsgang am geeignetsten:

Reinigungsoperationen	μ Mole Reaktions- produkt
<u>Reaktionsansatz</u>	
Inkubation $\downarrow$ 30 Min. bei 37°	345 μ M (+)-Aldenydsäure ein- gesetzt
<u>Denaturierter Hefe-Extrakt</u>	
Zentrifugation $\downarrow$	
<u>Proteinfreier Überstand</u>	
1. Äther - $\downarrow$ perforation	
<u>Ätherextrakt</u>	161 μ M (+)-Mevalonat (46,7 %)
Dowex 50 (H ⁺) $\downarrow$	
<u>saure Eluate</u>	
Dowex 1 (Cl ⁻) $\downarrow$	
<u>neutrale Eluate</u>	
2. Äther - $\downarrow$ perforation	
<u>Ätherextrakt</u>	
Chromatographie $\downarrow$ an Celite	
<u>Rückstand der Fraktionen</u>	140,3 μ M (+)-Mevalonat (40,7 %)



Bei mehrstündiger Perforation saurer, salzgesättigter, wässriger Mevalonsäurelösungen mit Äther geht das Mevalolacton vollständig in die ätherische Phase und kann nach Abdampfen des Äthers und Aufnehmen des Rückstandes in H₂O quantitativ im enzymatischen Test erfasst werden. Durch die schrittweise Elution an Dowex 50- und Dowex 1-Säulen werden kationische und anionische Bestandteile aus dem Reaktionsprodukt entfernt, das anschliessend an Celite weitergereinigt und dort von den letzten Resten nichtumgesetzter Aldehydsäure befreit wird. Im Rückstand der 3. Ätherextraktion liess sich mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin kolorimetrisch nicht mehr als 1 % Aldehyd bezogen auf den (+)-Mevalonat-Gehalt nachweisen. Titration mit Barytlauge und Kristallisation als N,N'-Dibenzyläthylendiammonium-Salz führte schliesslich zu einem Mevalonat, das in seinen physikalischen Eigenschaften (UV-Spektrum, Schmelzpunkt, Verhalten bei der Hochspannungspapieroelektrophorese) mit synthetischem, nach dem Verfahren von Eggerer (21) hergestelltem ([±])-Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat identisch war. Die prozentuale Ausbeute an Mevalonsäure bezüglich der eingesetzten Aldehydsäure-Menge auf den verschiedenen Reinigungsstufen ist im obigen Schema angegeben. Der Unterschied zwischen enzymatisch

bestimmtem und durch Titration gefundenem Mevalonsäure-Gehalt liess die ersten Zweifel am stereospezifischen Verlauf der Aldehydsäure-Reduktion aufkommen.

Durch die Mevalonatkinase-Reaktion wird nur das (+)-Enantiomere der Mevalonsäure erfasst, während andere Bestimmungsmethoden wie Titration und Hydroxamsäurebildung den Gesamtgehalt an (+)- und (-)-Mevalonsäure wiedergeben. Da sich das Ende der alkalischen Verseifung von Mevalonsäurelacton mit Barytlauge wegen der Verzögerung des Indikatorumschlages gegen Ende der Titration nicht genau ermitteln lässt, bestimmten wir den optischen Reinheitsgrad des enzymatisch gewonnenen Mevalonats durch einen Vergleich der enzymatisch mit der Mevalonatkinase und kolorimetrisch mit dem Hydroxamsäuretest ermittelten Mevalonsäure-Werte. Für die Bestimmungen wurden Lösungen bekannter Konzentration von synthetischem und enzymatisch gewonnenem K- und Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. (I) und (II) zusammengefasst. Auf Grund der Hydroxamsäurebestimmung besteht sowohl das enzymatisch wie das synthetisch hergestellte Mevalonat zu 100 % aus Mevalonsäure, da die gefundenen Werte auf der gleichen Eichkurve liegen (Abb. 4).

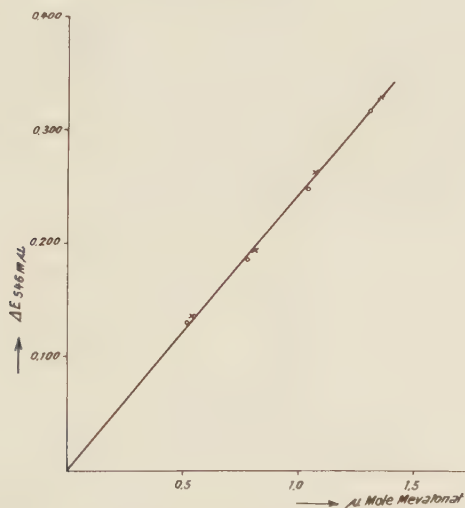


Abb. 4 Hydroxamsäurebildung aus
($\pm$)-Mevalolacton (synthet.) —○—○—
und Mevalolacton (enzymat.) —x—x—

In der Reaktion mit Mevalonatkinase wird synthetisches ($\pm$)-Mevalonat infolge des stereospezifischen Reaktionsverlaufes zu 50 % phosphoryliert, das enzymatisch erhaltene Mevalonat aber in allen Messungen nur zu 75 % und nicht zu 100 %, wie man bei spezifischer Reduktion von (+)-Aldehydsäure zu (+)-Mevalonsäure erwarten müsste (Abb. 5).

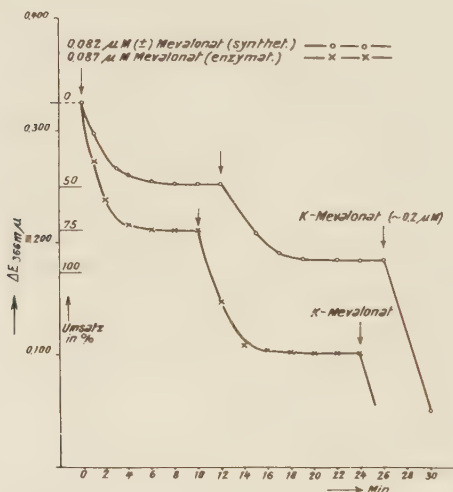


Abb. 5 Enzymatische Phosphorylierung.
Von synthetisch und enzymatisch hergestellter
Mevalonsäure.

Tabelle (I): Bestimmung des (+)-Mevalonsäure-Gehaltes
enzymatisch und synthetisch bereiteter
Mevalonsäure mit der Mevalonatkinase-Reaktion

Eingesetztes Produkt	$\Delta E_{366 \text{ m}\mu}$ pro 0,01 ml	Testvol. (ml)	(+)-Mevalonat ($\mu\text{M/ml}$)	(+)-Mevalonat -Gehalt in %
K-Mevalonat (enz.)	0,114	1,89	6,53	75,0
K-Mevalonat (synth.)	0,072	1,89	4,11	50,0
DBÄD-Mevalonat (enz.)	0,138	1,885	7,88	74,7
DBÄD-Mevalonat (synth.)	0,084	1,89	4,81	49,7

Da nach den Befunden von Lynen und Grassl (19) das Dibenzyl-
äthylendiammoniumsalz von (-)-Mevalonsäure einen ausserordentlich
kleinen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = -1,38^\circ$ zeigt und uns nur geringe
Substanzmengen zur Verfügung standen, beschränkten wir unsere Un-
tersuchung des optischen Reinheitsgrades der enzymatisch aus
Aldehydsäure hergestellten Mevalonsäure auf die sehr viel empfind-
lichere enzymatische Bestimmungsmethode mit Mevalonatkinase unter
Ausnutzung der erwähnten Enzymstereospezifität.

Tabelle (II): Vergleich des Mevalonsäuregehaltes enzymatischer und synthetischer Mevalonsäure mit der kolorimetrischen Hydroxamsäuremethode

Eingesetztes Produkt	ml Test- lösung	$\Delta E_{546 \text{ m}\mu}$	$\mu\text{M Mevalonsäure}$
enzymat.	0,02	0,135	0,54
bereitetes	0,03	0,193	0,81
Mevalonsäure-	0,04	0,264	1,08
lacton	0,05	0,328	1,35
synthet.	0,02	0,130	0,52
($\pm$)-Mevalon-	0,03	0,186	0,78
säure-	0,04	0,249	1,04
lacton	0,05	0,318	1,31

Der mit der Hydroxamsäuremethode bewiesene identische Mevalonsäuregehalt der beiden Dibenzyläthylendiammonium-Salze spricht bereits gegen eine Verunreinigung des enzymatisch gewonnenen Mevalonats mit Fremdstoffen. Zum gleichen Resultat führte die Messung der UV-Spektren in 0,1 M K-Phosphatpuffer von pH 7, denen wir einen annähernd gleichen Dibenzyläthylendiammonium-Gehalt entnehmen (Abb. 6). Die geringen Extinktionsunterschiede liegen innerhalb der Fehlergrenzen, die durch Schwankungen des Messgerätes (Zeiss-Spektrophotometer) sowie Einwaage- und Verdünnungsfehler in Kauf genommen werden müssen.

Weitere Reinheitskriterien sind die Hochspannungspapierelektrophorese im Pyridin-Acetatpuffer von pH 6,2, bei der beide Mevalonsäuren an die gleiche Stelle wanderten (Abb. 7), der negative Ausfall der Aldehydbestimmung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin und das Fehlen einer Schmelzpunktsdepression beim Vermischen von enzymatisch und synthetisch vorbereitetem Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat.

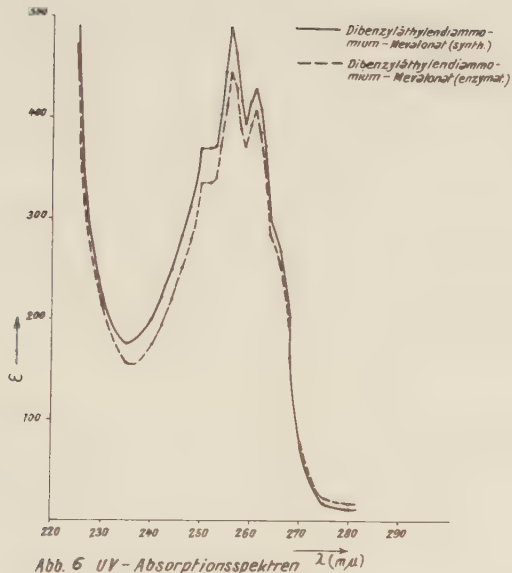
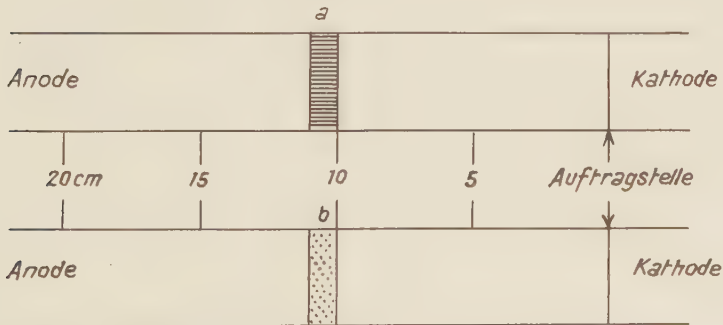


Abb. 6 UV-Absorptionsspektren λ (nm)

Abb. 7 Papierelektrophoretische Identifizierung von synthetischem ($\pm$)-Mevalonat und enzymatisch erhaltener Mevalonsäure



Um endgültig zu beweisen, dass es sich bei dem im Mevalonatkinase-Test nicht phosphorylierten sauren Bestandteil um (-)-Mevalonsäure handelt, inkubierten wir eine durch enzymatische Aldehydsäure-Reduktion erhaltene K-Mevalonat-Lösung bekannter Konzentration mit gereinigter Mevalonatkinase und ATP, trennten die nicht phosphorylierte (-)-Mevalonsäure durch Ätherperforation aus dem die ätherunlösliche 5-Phospho-(+)-mevalonsäure enthaltenden Inkubationsgemisch ab und identifizierten das im Ätherextrakt befindliche (-)-Mevalonsäurelacton mit der kolorimetrischen Hydroxamsäuremethode, durch Hochspannungspapierelektrophorese und Papierchromatographie der Hydroxamsäuren in wassergesättigtem n-Butanol (28). Die Mevalonsäurebestimmung mit der Mevalonatkinase fiel, wie erwartet, negativ aus.

Diese Befunde sprechen eindeutig für einen sterisch unspezifischen Verlauf der Aldehydsäure-Reduktion. Eine genauere Untersuchung der Kinetik des Aldehydsäure-Verbrauchs mit der Methode von Friedemann und Haugen (22) war daher notwendig. Abb. 8 zeigt das Ergebnis der Inkubation von ($^{+}$)-Aldehydsäure mit einem mehrere Monate bei -16° aufbewahrten Hefepräparat: nach 30 Min. sind bereits 66,5 % reduziert, nach 60 Min. 76 %. Die Reaktion bleibt also nicht bei 50 proz. Umsatz stehen.

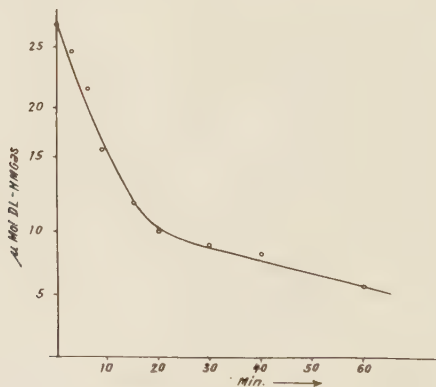


Abb. 8 Zeitabhängigkeit der HMGA-Reduktion durch gealterte Hefepräparate

Für die weiteren kinetischen Versuche verwendeten wir durch Schlossmann-Aufschluss nach Methode (3) hergestellte Enzympräparate. Wie Abb. 9 zeigt, verläuft die Reduktion in diesem Fall langsamer als mit "gefrorenen" Hefezellen, bricht aber auch hier nicht bei 50 proz. Umsatz ab. Nach 60 Min. sind 51,8 % der eingesetzten Aldehydsäure reduziert worden.

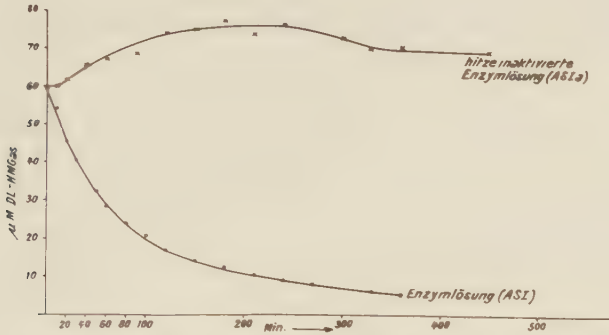
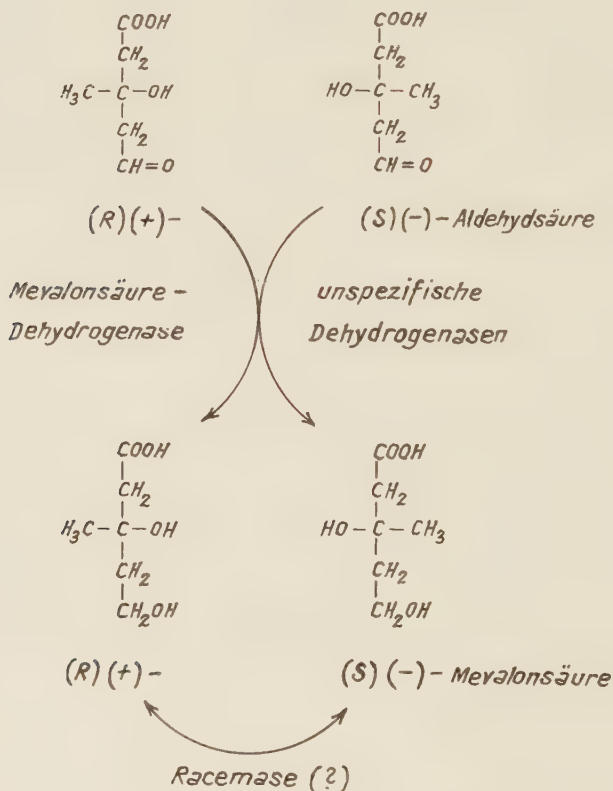


Abb. 9 Zeitabhängigkeit der HMGase-Reduktion durch zellfreie Enzymlösungen

Um nichtenzymatische Effekte auszuschliessen, wurde in einem Blindversuch an Stelle der aktiven Enzymlösung eine hitzeinaktivierte, zentrifugierte Enzymlösung eingesetzt und die Zeitabhängigkeit der Reduktion verfolgt (Abb. 9). Nach einer Induktionsperiode von 10 Min. steigt die Aldehydkonzentration an und erreicht schliesslich einen konstanten Wert. Da der Dinitrophenylhydrazin-Test ausser der Aldehydsäure auch andere Aldehyde erfasst, lässt sich der beobachtete Extinktionsanstieg nur durch ein Entstehen von Fremd-Aldehyden unter Mitwirkung der zugesetzten Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment) im Verlauf der Inkubation erklären.

Es besteht noch die Möglichkeit einer Abnahme der Aldehydkonzentration durch Oxydation, wobei β -Hydroxy- β -methylglutarsäure entstehen sollte. Um diese Möglichkeit auszuschliessen, führten wir einen weiteren Blindversuch durch, in dem wir die Enzymlösung ohne das reduzierende Glucose-6-phosphat-TPN-Zwischenferment-System mit $(\pm)$ -Aldehydsäure inkubierten. Auch in diesem Versuch wurde keine Aldehydabnahme beobachtet.

Auf Grund dieser Versuche ergibt sich folgendes Bild der enzymatischen Reduktion von $(\pm)$ -Aldehydsäure zu Mevalonsäure:



Neben der rasch verlaufenden stereospezifischen Reduktion von (R) (+)-Aldehydsäure zu (R) (+)-Mevalonsäure durch die TPNH-spezifische Mevalonsäure-Dehydrogenase liegt noch ein zweiter Effekt vor, in dem auch die (S) (-)-Aldehydsäure durch unspezifisch wirkende Alkohol-Dehydrogenasen in langsamer Reaktion zu (S) (-)-Mevalonsäure reduziert wird.

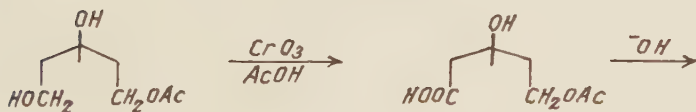
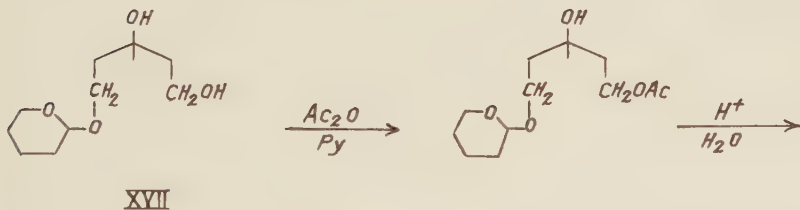
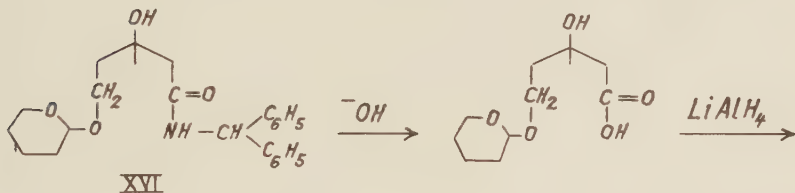
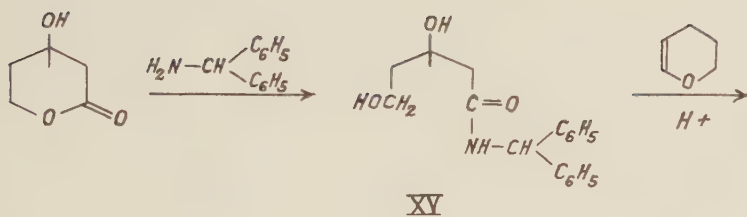
Gegen das Vorhandensein einer Racemase, welche die beiden Enantiomeren der Mevalonsäure wechselseitig ineinander umwandelt in Analogie zu der von Kaplan (29) in *Clostridium butylicum* gefundenen Lactat-Racemase, spricht die vollständige Reduktion der eingesetzten racemischen Aldehydsäure bei genügend langen Inkubationszeiten. Wäre eine Racemase für den unspezifischen Verlauf der Aldehydsäure-Reduktion verantwortlich, so sollte die Reaktion bei 50 proz. Umsatz stehen bleiben und die entstandene (+)-Mevalonsäure racemisiert werden, so dass das Reaktionsprodukt zu 25 % aus (+)-Mevalonat und zu 25 % aus (-)-Mevalonat bestehen müsste.

II. Versuche zur Konfigurationsumkehr optisch aktiver Mevalonsäure

Im Rahmen der Arbeiten über die Biosynthese der Terpene beschrieben Lynen und Grassl (19) eine Darstellung von (-)-Mevalonsäure durch bakterielle Racematspaltung. Zur Überführung dieses biologisch inaktiven Enantiomeren in aktive (+)-Mevalonsäure versuchten wir an Hand synthetischer, nach den Vorschriften von J.W. Cornforth et al. (30) und C.H. Hoffman et al. (8) aus Methylvinylketon bereiteter (+)-Mevalonsäure ein Verfahren auszuarbeiten, das unter Schutz des empfindlichen Asymmetriezentrums eine Reduktion des Carboxylendes und eine Oxydation des Hydroxylendes der Mevalonsäure gestattet. Die Hauptschwierigkeit dabei war die Fixierung der ausserordentlich leicht in ihr stabiles Sechsring-Lacton übergehenden Mevalonsäure in der offenen, für einen oxydativen und reduktiven Angriff geeigneten Form.

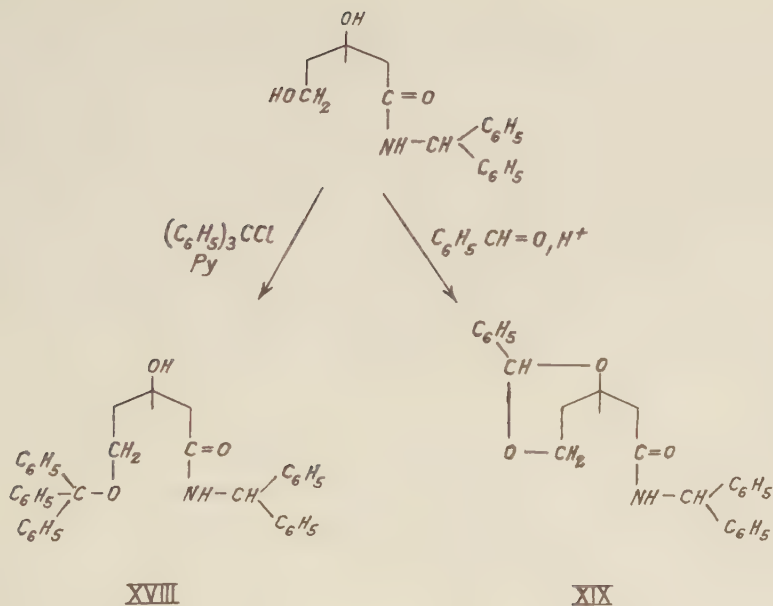
Einleitende Versuche, Mevalonsäurelacton in absolutem Methanol mit HCl-Gas als Katalysator, mit Dimethylsulfat, Diazomethan (31) oder der Silbersalzmethode (32) zu verestern, blieben ohne Erfolg.

Wir versuchten daher zunächst vom kristallinen Mevalonsäurebenzhydrylamid (XV) ausgehend einen Weg zur Lösung des Problems zu finden. Unser Plan war Schutz der primären Hydroxylgruppe durch Veräthern mit Dihydropyran, anschliessend alkalische Hydrolyse des Tetrahydropyranyläthers (XVI) und Reduktion der freien oder veresterten Carboxylgruppe zum 5-O-Tetrahydropyranyl-3-methyl-pentandiol-(1, 3) (XVII). Acetylierung der primären Hydroxylgruppe, saure Spaltung des Tetrahydropyranyläthers, Chromsäure-Oxydation und alkalische Verseifung der Acetylgruppe würden dann zur Mevalonsäure zurückführen:



Nach D.E. Wolf et al. (33) lässt sich Mevalonsäurebenzhydrylamid durch 1-stündiges Erhitzen auf 120° in 0,25 n NaOH quantitativ zur Mevalonsäure verseifen. Alle unsere Versuche, das auf die angegebene Weise synthetisierte 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydrylamid (XVI) alkalisch in wässrig-methanolischer Lösung, in wässrigem Methylcellosolve oder rein wässriger Lösung unter Verwendung eines Vibrators zur ständigen Durchmischung der in diesem Fall inhomogenen Lösung unter Rückflusskochen zu verseifen, schlugen fehl. Bei längeren Reaktionszeiten, z.B. 20-stündigem Erhitzen in wässrigem, alkalihaltigem Methylcellosolve, Bedingungen unter denen Mevalonsäurebenzhydrylamid rasch verseift wird, wie ein Parallelversuch zeigte, findet teilweise Abspaltung des Tetrahydropyranyl-Restes statt, was aus dem IR-Spektrum eines in kleinen Mengen isolierten kristallinen Reaktionsproduktes hervorgeht. Dass es sich bei diesem Produkt noch um unverändertes Benzhydrylamid handelt, zeigen die Amid I- und Amid II-Valenzschwingungen, die Bande für monosubstituiertes Phenyl im IR-Spektrum sowie das charakteristische Benzhydrylamid-UV-Spektrum. In den Reaktionsansätzen der Vibromischerversuche liess sich papierelektrophoretisch eine im Verhältnis zur aufgetragenen Substanzmenge verschwindend kleine Säure-Menge mit einer Laufstrecke von 10 cm nachweisen. Mevalonsäure wanderte im gleichen Pherogramm 13 cm weit.

Nach diesem negativen Befunde bei der Verseifung des Tetrahydropyranyläthers hofften wir durch die Verwendung einer anderen Schutzgruppe die Schwierigkeit umgehen zu können und stellten daher durch Reaktion von Mevalonsäurebenzhydrylamid mit Triphenylmethylchlorid in Pyridin (34) das 5-O-Trityl-mevalonsäurebenzhydrylamid (XVIII), durch Umsetzung mit Benzaldehyd in Dimethylformamid unter Zusatz einer Spur konz. H_2SO_4 das 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamid (XIX) her:



Milde saure Hydrolyse des 5-O-Tetrahydropyranyl- und 5-O-Trityl-mevalonsäurebenzhydrylamids führte zum Mevalonsäurebenzhydrylamid zurück. Das gegen Säure beständigere Benzal-Derivat (XIX) lieferte bei stärker saurer Hydrolyse in einem Gemisch von Äthanol-Eisessig-n H_2SO_4 direkt unter gleichzeitiger Verseifung der Amidbindung Mevalonsäure zurück.

Die Struktur dieser 5-O- bzw. 3,5-O-substituierten Mevalonsäurebenzhydrylamide wurde ausserdem durch C,H-Analyse, IR- und UV-Spektrum sichergestellt.

Gegen alkalische Verseifung waren auch die 5-O-Trityl- und 3,5-O-Benzyliden-Verbindungen völlig beständig. Mit Ausnahme sehr krasser Fälle, in denen die Substanz längere Zeit unter Rückfluss erhitzt wurde, liess sich das Ausgangsprodukt aus den Ansätzen

zurückgewinnen. In keinem Fall waren freie, auf eine Spaltung der Amidbindung hindeutende freie Carbonsäuren papierelektrophoretisch nachweisbar.

Um eine Basis für die Diskussion dieser fehlgeschlagenen alkalischen Hydrolyse-Versuche zu haben, nahmen wir die Kinetik der Hydrolyse des unsubstituierten Mevalonsäurebenzhydrylamids in 0,25 n wässriger NaOH und 0,49 n $\text{Ba}(\text{OH})_2$ auf. Der Mevalonsäure-Gehalt der zur Zeit t dem Reaktionsgemisch entnommenen Proben wurde enzymatisch mit der Mevalonatkinase bestimmt. Das Ergebnis der Verseifung mit Barytlauge zeigt Abb. 10.

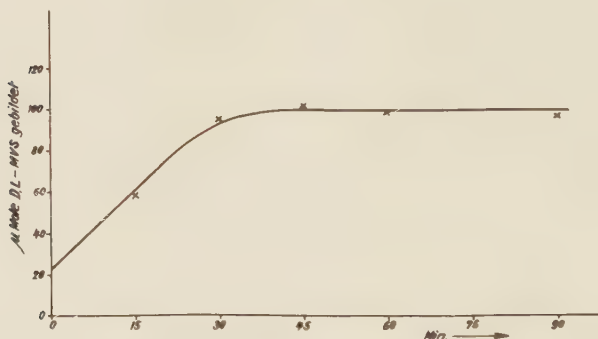
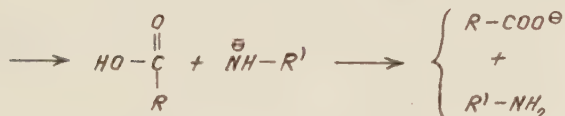
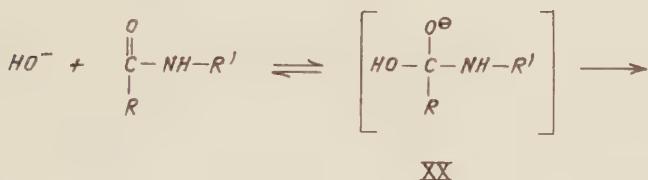


Abb. 10 Kinetik der alkalischen Hydrolyse von Mevalonsäurebenzhydrylamid mit 0,49 n $\text{Ba}(\text{OH})_2$

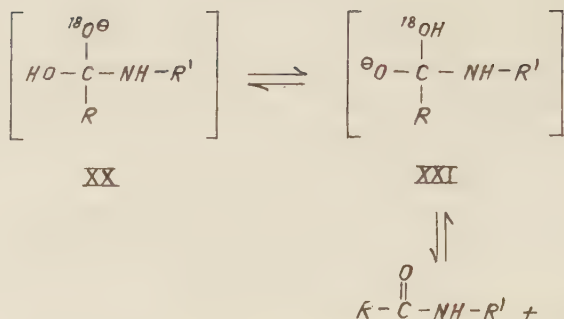
Da sich das Benzhydrylamid erst in der heissen Barytlauge löst, ist beim Messbeginn (Siedeanfang) schon ein kleiner Teil des Benzhydrylamids verseift; nach 45 Min. ist die Reaktion vollständig beendet im Einklang mit den Befunden von D.E. Wolf et al. (33).

Diskussion der Hydrolyse-Versuche

Obwohl von allen untersuchten Benzhydrylamiden das unsubstituierte Mevalonsäurebenzhydrylamid am wasserlöslichsten ist, kann ein blosser Löslichkeitseffekt nicht zur Erklärung der Unverseifbarkeit der am primären (bzw. tertiären) Hydroxyl geschützten Benzhydrylamide herangezogen werden. In allen Fällen, in denen Alkohol/Wasser-Gemische oder rein organische Gemische als Lösungsmittel verwendet wurden, war das zu verseifende Amid klar gelöst. Wie ein Blick auf den Mechanismus der basischen Amidhydrolyse zeigt, ist für die Verseifung nur das OH^- -Ion notwendig:



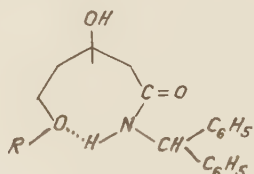
Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktion ist die Bildung des Zwischenproduktes (XX), das eine hinreichend lange Lebensdauer haben muss, um einen Protonenaustausch zwischen den Sauerstoffatomen zu gewährleisten. Das geht aus Befunden von M.L. Bender et al. (35, 36) hervor, die bei der basischen Hydrolyse von Benzamid- ^{18}O Sauerstoffaustausch mit dem Lösungsmittel feststellten. Sie stoppten die Reaktion zu bestimmten Zeiten ab und fanden im reisolierten nichtverseiften Benzamid einen geringeren ^{18}O -Gehalt, was für Isomerisierung des Zwischenproduktes (XX) zum Zwischenprodukt (XXI) und Freisetzung von $^{18}\text{OH}^-$ in der einleitenden Gleichgewichtsreaktion spricht:



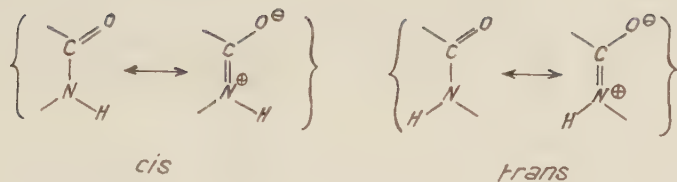
Der primäre Schritt bei der alkalischen Amidverseifung ist also die Addition von OH^{-} an den Carbonylkohlenstoff unter Aufrichtung der $\text{C} = \text{O}$ -Doppelbindung.

Unsere Befunde lassen die ausserordentlich erschwerte alkalische Verseifbarkeit der 5-O-substituierten Benzhydrylamide als Normalfall erscheinen und sprechen für eine anomale Beschleunigung der Hydrolyse bei dem an der primären Hydroxylgruppe unsubstituierten Mevalonsäurebenzhydrylamid.

Eine Fixierung der Amidgruppierung durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem H-Atom der Amid-NH-Gruppe und einem Äthersauerstoff



kommt schon aus thermodynamischen Gründen kaum in Betracht. Die Amidmesomerie zwingt die $\text{CO}-\text{NH}$ -Gruppierung in zwei planare Konfigurationen (cis und trans) (37)

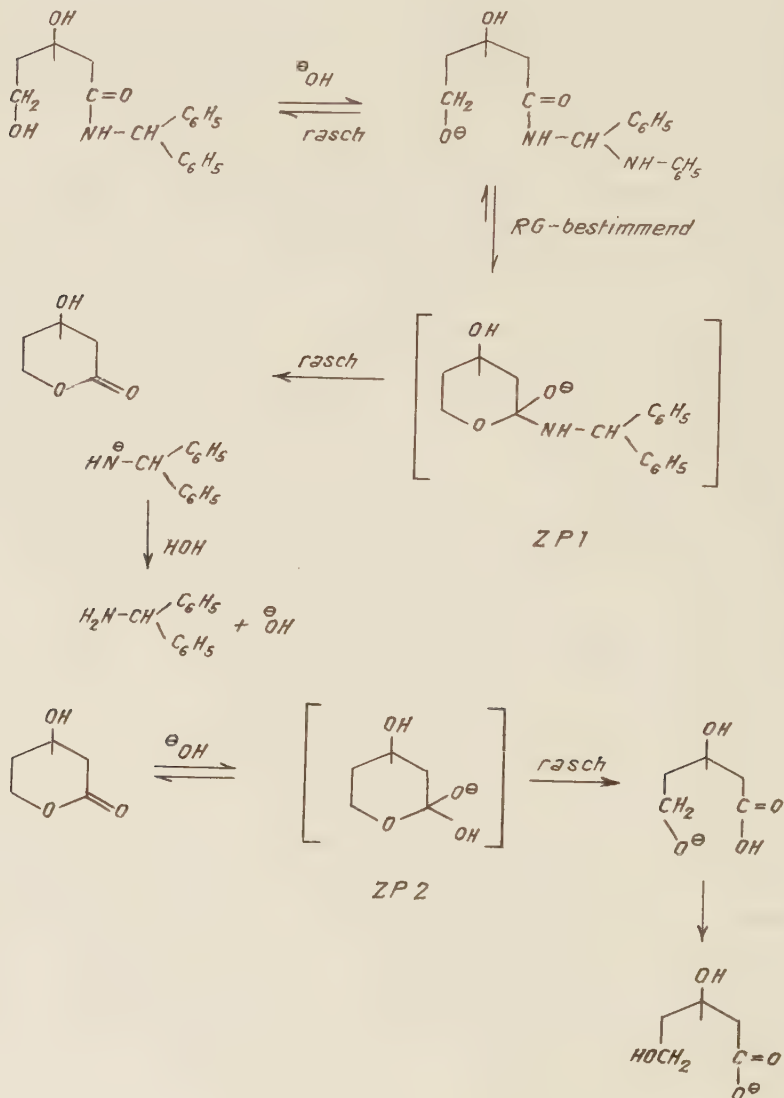


so dass aus sterischen Gründen Einbezug des Amid-H-Atoms in einen Wasserstoffbrücken-Achtring (ganz abgesehen von der Labilität einer solchen H-Brücken-Bindung) sehr unwahrscheinlich ist. Diese Struktur wird endgültig ausgeschlossen durch das Ergebnis der IR-spektroskopischen Untersuchung.

Die Amid I- und Amid II-Banden liegen in den IR-Spektren der 5-O-substituierten Mevalonsäurebenzhydrylamide sowie der unsubstituierten Verbindung einheitlich bei $6,0\mu$ und ca. $6,7\mu$ und sprechen für das Vorliegen der freien unbeeinflussten Amidgruppierung.

Wir nehmen daher zur Erklärung der Erleichterung der alkalischen Mevalonsäurebenzhydrylamid-Hydrolyse eine intramolekulare Beteiligung der primären Hydroxyl-Gruppe beim Verseifungsvorgang selbst an und schlagen einen Mechanismus vor, in dem der primäre Angriff auf die Amidcarbonyl-Gruppe nicht durch ein OH^- der Lösung, sondern intramolekular durch die in der Alkoholatform vorliegende primäre Hydroxylgruppe erfolgt. Die Bildung des Zwischenproduktes (ZP 1) dürfte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion sein, da zur Aufhebung der Amidmesomerie unter Bildung eines tetraedrischen C-Atoms aus dem trigonalen Carbonylkohlenstoff die Überwindung eines Aktivierungsberges erforderlich ist. Es schließt sich der rasche Zerfall des Zwischenproduktes (ZP 1) in Mevalonsäurelacton und Benzhydrylamin-Anion unter Wiederherstellung des trigonalen Carbonylsystems an. In der letzten Stufe erfolgt die alkalische Lactonhydrolyse unter Anlagerung eines Hydroxyl-Ions der Lösung an das Carbonyl-C-Atom, die im Falle des Sechsring-

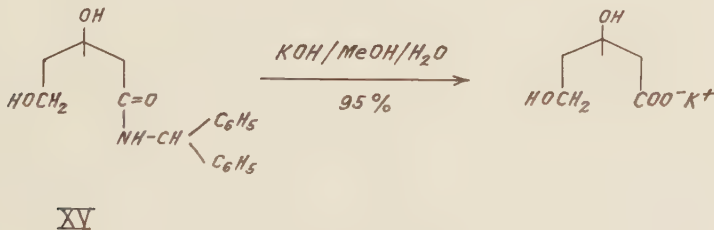
lactons sehr rasch erfolgt, wie kinetische Messungen von R. Huisgen und H. Ott (37) ergaben:

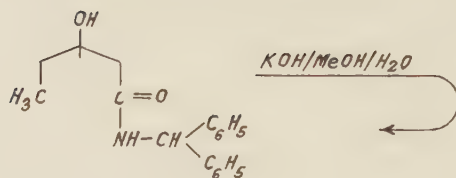


Es liegt hier also ein interessanter Fall von Nachbargruppenbeteiligung einer Alkoholat-Gruppe vor, wie sie besonders bei der Hydrolyse von 1,2-Bromhydrinen, die unter Epoxydbildung verläuft, untersucht wurde (vgl. z.B. 38).

Um diesen von uns vorgeschlagenen Verseifungsmechanismus experimentell zu unterbauen, stellten wir β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamid (XXII) her und studierten sein Verhalten bei der alkalischen Hydrolyse. Da dieser Verbindung die primäre Hydroxylgruppe in der 5-Stellung fehlt, fällt eine Erleichterung der Verseifung durch intramolekulare Alkoholyse der Amidbindung ausser Betracht, zudem sind sterische Faktoren (möglicherweise verursacht durch grosse Substituenten an der primären Hydroxylgruppe, was aber wegen der freien Drehbarkeit des aliphatischen Bindungssystems unwahrscheinlich ist) und Wasserstoffbrücken unter Beteiligung der letzteren von vornherein ausgeschaltet.

Um einen exakten Vergleich zu haben, führten wir die Verseifungen des Mevalonsäurebenzhydrylamids (XV) und des β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamids (XXII) unter gleichen Reaktionsbedingungen (3 Stunden Rückfluss bei 100°) in einem Überschuss 1 n methanolisch-wässriger KOH (Methanol - H₂O = 1:1) durch und fanden im ersteren Falle bei der Aufarbeitung Mevalonsäure in 95 % Ausbeute. Aus dem β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamid-Ansatz wurde 95 % unverändertes Ausgangsmaterial zurückgewonnen und durch Schmelzpunkt und UV-Spektrum identifiziert.

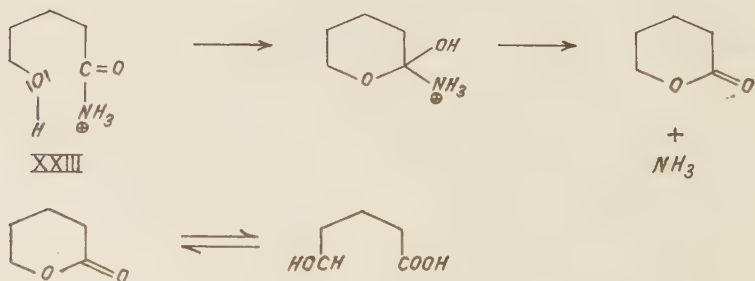




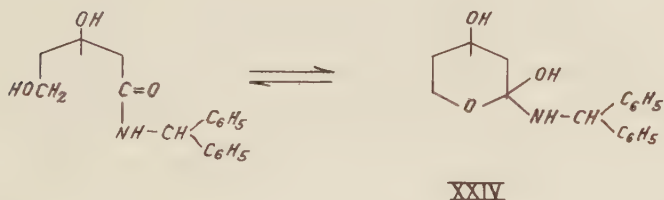
XXII

Die grosse Stabilität der Amidbindung gegenüber Alkali im β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydridamid gibt sich aus der Tatsache zu erkennen, dass selbst bei 20-stündiger Reaktion in 1 n methanolisch-wässriger KOH unter Rückfluss 95 % Ausgangsmaterial zurückgewonnen wurden. Papierelektrophoretisch war in beiden Fällen keine Spur β -Hydroxy- β -methylvaleriansäure nachzuweisen.

Nach Abschluss dieser Arbeiten fanden wir in der Literatur Hinweise, dass auch die Säurehydrolyse von δ -Hydroxy- (sowie γ -Hydroxy-) carbonsäureamiden durch intramolekulare Alkoholyse der Amidbindung beschleunigt ist. Nach kinetischen Messungen von L. Zürn (39) beträgt die RG-Konstante für die Hydrolyse von δ -Hydroxyvaleramid in 1 n HCl bei 30° ($c = 0,1$ Mol/l) $16,8 \cdot 10^{-3} [\text{Min}^{-1}]$. Wie im Falle der sauren Hydrolyse von Hydroxylysyl-peptiden (40) scheint auch beim δ -Hydroxyvaleramid (XXIII) die Verseifung über das entsprechende Lacton zu verlaufen:



Im Zusammenhang mit dieser beschleunigenden Wirkung der primären Hydroxylgruppe auf die Amidverseifung interessierte uns die Frage, ob Mevalonsäurebenzhydrylamid in Lösung im Gleichgewicht mit einer Tetrahydropyran-2,4-diol-Form (XXIV) steht



also nicht die offene Form, sondern gleich die cyclische Halbacetal-Form bei der alkalischen Hydrolyse reagiert. Wie aus der Literatur bekannt ist (41), bestehen z.B. Tetrahydropyran-2-ol (XXV) und Tetrahydrofuran-2-ol (XXVI) aus Gleichgewichtsgemischen der cyclischen Formen mit den entsprechenden acyclischen Strukturen 5-Hydroxypentanal und 4-Hydroxybutanal:



Die IR-Spektren der beiden Alkohole in flüssigen Filmen und in CCl_4 (41) zeigen, dass etwa 4 % in der offenkettigen Form existieren.

Um die angeschnittene Frage und die Frage nach Wasserstoffbrückenbindungen im Mevalonsäurebenzhydrylamid und den anderen von uns hergestellten Benzhydrylamiden zu klären, wandten wir uns der IR-Spektroskopie dieser Verbindungen in flüssiger Phase zu.

IR-spektroskopische Untersuchungen

Da die synthetisierten Benzhydrylamide mit Ausnahme des 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydrylamids in CCl_4 schwer löslich sind, wurden die vollständigen Spektren im Wellenlängenbereich von 2 bis 12μ in CHCl_3 aufgenommen ¹⁾.

Quantitative Messungen der Absorptionen im OH-Valenzschwingungsbereich ($2,6$ bis $3,1\mu$) führten wir mit dem Beckman-Spektrophotometer DK 1 in verdünnten CCl_4 - und CHCl_3 -Lösungen (0.01 bis 0.0025 M) durch. Um geeignete Bezugswerte für Lage und Intensität der Hydroxylbanden zu erhalten, nahmen wir zunächst die Absorptionskurven einiger einfacher Alkohole in CCl_4 auf, bei denen keine intramolekularen Wasserstoffbrücken auftreten können. Das Ergebnis zeigt Tabelle (III) und Abb. 11.

Tabelle (III): IR-spektroskopische Daten für einige einfache Alkohole

Substanz	Konz. (CCl_4)	IR-Absorptionen (freie OH-Bande)		
		$\lambda (\mu)$	$\tilde{\nu} (\text{cm}^{-1})$	ϵ
Äthanol	0.01 M	$2,77$	3610	$28,2$
Citronellol	0.01 M	$2,77$	3610	$41,5$
tert. Butanol	0.01 M	$2,78$	3600	$25,8$

¹⁾ Für die Aufnahme dieser Spektren mit dem Perkin-Elmer-Spektrophotometer (Modell 21) bin ich Frl. I. Köhler, Max Planck-Institut für Biochemie, München, zu besonderem Dank verpflichtet.

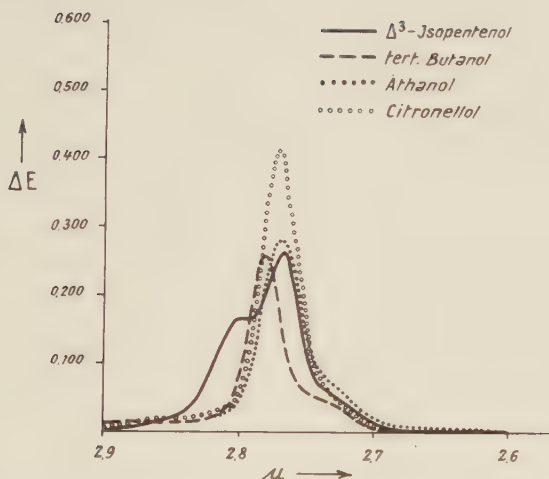


Abb. 11 Absorptionsspektren einiger Alkohole im OH-Valenzschwingungsbereich

Die drei angeführten Verbindungen geben einzelne scharfe Banden:
 primäre Hydroxylgruppe: 3610 cm^{-1} ,
 tertiäre Hydroxylgruppe: 3600 cm^{-1} .

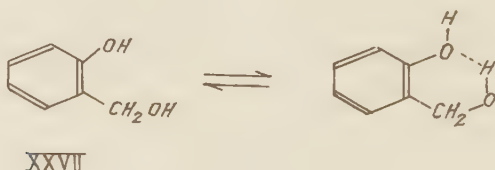
Δ^3 -Isopentenol zeigte in 0.005 M Konzentration in CCl_4 eine breite Absorptionsbande mit Maximum bei $2,767 \mu$ (3615 cm^{-1} ; $\epsilon \sim 26,5$) und einer Schulter bei $2,8 \mu$ (3570 cm^{-1}). Es ist danach auf Grund von Messungen der OH-Schwingungsfrequenzen nicht möglich, eindeutig zwischen primären, sekundären und tertiären Hydroxylgruppen zu unterscheiden, worauf auch Anet und Bavin (42) hinweisen. Sie fanden für primäre Alkohole 3636 cm^{-1} (Methanol-

Dodecylalkohol), sekundäre 3623 cm^{-1} (Isopropanal, sek.-Butanol), tertiäre 3615 cm^{-1} (tert.-Butanol), 3606 cm^{-1} (Triphenylcarbinol). Tertiäre 17α -Hydroxy-steroiden zeigen die freie Hydroxylbande bei 3618 cm^{-1} und eine zweite Bande bei 3500 cm^{-1} , die entsprechend folgendem Gleichgewicht auf intramolekular gebundenes Hydroxyl zurückzuführen ist (43):



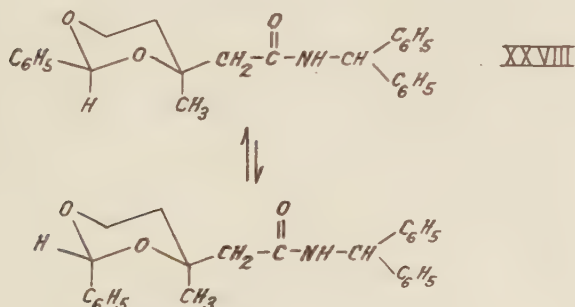
Die Wellenzahl 3618 cm^{-1} wird auch von Cole und Jefferies (44) für tertiäre alicyclische Alkohole angegeben.

o-Hydroxy-benzylalkohol (XXVII) besitzt eine scharfe Bande bei 3600 cm^{-1} (freies OH) und eine zweite bei 3436 cm^{-1} (intramolekular gebundenes OH) und scheint daher im Gleichgewicht mit einem H-Brücken-Sechsring zu stehen (45):



Die IR-spektroskopische Untersuchung der Mevalonsäurebenzhydrylamide und des β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamids in CHCl_3 zeigte völlig normale Amidspektren mit starken

Amid I- und Amid-II-Banden bei 6,0 und 6,65 μ (Abb. 12, S. 52), der assoziierten OH- und NH-Schwingung bei 2,92 μ und einer intensiven CH-Bande bei 3,36 μ . Hinzu kommen in den Spektren des 5-O-Tetrahydropyranyl-, 5-O-Trityl- und 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamids Acetal- bzw. Ätherbanden. Besonders schön zeigt das KBr-Spektrum des 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamids (Abb. 13, S. 53) die 5 von Bergmann und Pinchas (46) der Gruppierung (C-O-CH-O-C) zugeordneten Absorptionsbanden zwischen 1 200 und 1 000 cm^{-1} . Da in dieser Verbindung beide Hydroxylgruppen substituiert sind, erscheint im Spektrum (CHCl_3) die reine NH-Bande bei 2,97 μ (3368 cm^{-1}). In Übereinstimmung mit Befunden von M. Stacey u. Mitarb. (47) nehmen wir für die Bildung des Benzyliden-Derivates einen streng stereospezifischen Reaktionsverlauf an, in dem nur das Diastereomere mit der Amidseitenkette und dem Phenylrest in äquatorialen Positionen der 1,3-Dioxan-Sesselkonformation (XXVIII) entsteht, um die ungünstigen 1,3-Wechselwirkungen auf ein Minimum zu reduzieren:



Das Spektrum des Mevalonsäurebenzhydrylamids wurde bei verschiedenen Substanzkonzentrationen gemessen. Die identische Lage und Form der Banden in allen Aufnahmen spricht gegen ein Gleichgewicht der offenkettigen Form mit einem cyclischen Halbacetal (XXIV). Der gleiche Befund ergab sich aus den Verdünnungsreihen

der Spektren von 5-O-Tetrahydropyranyl- und 5-O-Trityl-mevalonsäurebenzhydrylamid. Um die Frage nach der Beteiligung der Hydroxylgruppen an intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zu entscheiden, untersuchten wir die Hydroxylabsorptionen der von uns synthetisierten Benzhydrylamide in Abhängigkeit von ihrer Konzentration in CHCl_3 oder CCl_4 mit dem Beckman-Spektrophotometer. Die Daten für Mevalonsäurebenzhydrylamid und β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamid sind in Tabelle (IV) bzw. Tabelle (V) zusammengestellt. Das Absorptionsspektrum des β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamids (Abb. 14) zeigt ein intensives Maximum bei 3420 cm^{-1} , das wir der gebundenen OH-Gruppe zuordnen, und ein erheblich schwächeres Maximum bei 3600 cm^{-1} (freies tert. OH).

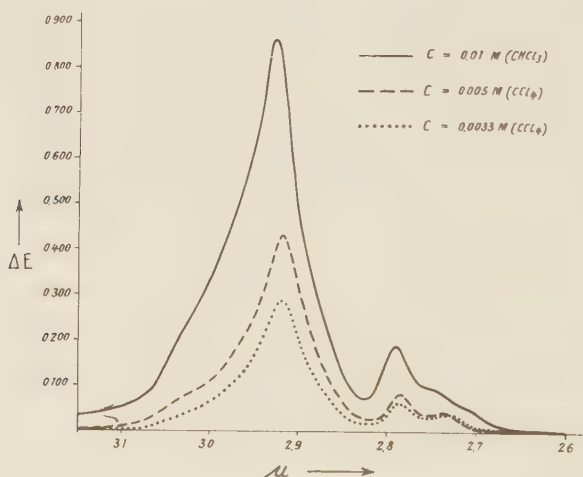


Abb. 14 Absorptionsspektrum von β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamid im Bereich der OH-Valenzschwingung

Die Absorptionsmaxima des Mevalonsäurebenzhydrylamids (Abb. 15) liegen bei 3610 cm^{-1} (freies OH) und 3423 cm^{-1} (gebundenes OH). Wellenzahl und Extinktionskoeffizienten der Maxima sind von der Verdünnung unabhängig, was gegen das Vorliegen intermolekularer Bindungen spricht.

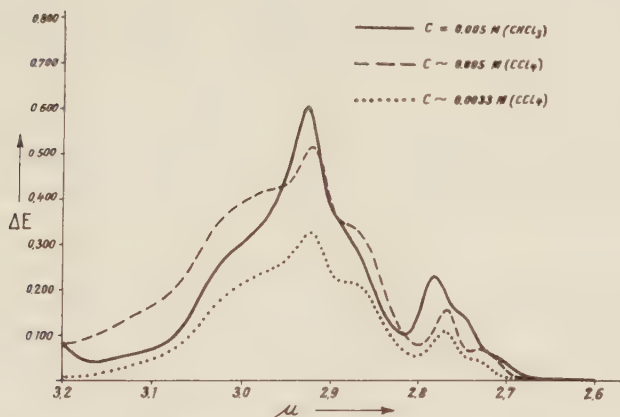
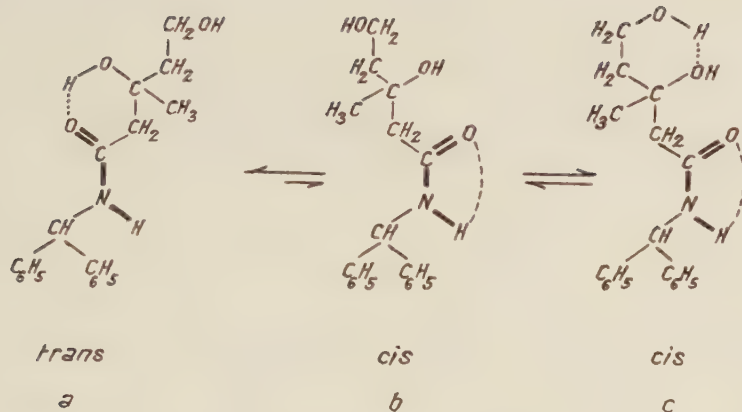


Abb. 15 Absorptionsspektrum von Mevalonsäure-benzhydrolamid im OH-Valenzschwingungsbereich.

Tabelle (IV): IR-spektroskopische Daten für
Mevalonsäurebenzhydrylamid

Konz. (CCl ₄)	IR-Absorptionsmaxima					
	tert. OH (frei)			OH (gebunden)		
	λ	$\bar{\nu}$	ϵ	λ	$\bar{\nu}$	ϵ
0.005 M	2,77	3610	31,6	2,92	3425	103,6
0.0033 M	2,77	3610	33,0	2,92	3425	98,5
Konz. (CHCl ₃)						
0.005 M	2,78	3600	46,0	2,925	3420	121,0

Wie bereits erwähnt, liegt die Amidgruppierung in zwei planaren, durch Mesomerie stabilisierten Konfigurationen (trans und cis) vor, von denen die trans-Konfiguration energetisch begünstigt ist. Durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Amidcarbonylgruppe und der tertiären OH-Gruppe ist eine zusätzliche Stabilisierung der trans-Konfiguration möglich, da im Falle der cis-Konfiguration der Carbonyl-Sauerstoff durch das H-Atom der NH-Gruppe abgeschirmt wird und nicht zur H-Brückenbildung mit der tertiären Hydroxylgruppe zur Verfügung steht. Bei Vorliegen der cis-Konfiguration ist im Falle des Mevalonsäurebenzhydrylamids ein energetisch sicher weniger stabiler H-Brücken-Sechsring zwischen der tertiären und primären Hydroxylgruppe in Betracht zu ziehen, so dass wir für diese Verbindung ein Gleichgewicht folgender Strukturen annehmen:



Die freie OH-Schwingung bei 3610 cm^{-1} ($\epsilon \sim 33$) schreiben wir der offenen *cis*-Struktur b zu, die gebundene intensive OH-Absorption bei 3425 cm^{-1} ($\epsilon \sim 100$) den Strukturen a und c. Die Schulter bei $\sim 3355\text{ cm}^{-1}$ ($\sim 2,98\mu$) dürfte auf Grund der im Spektrum des 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamids bei ca. $2,97\mu$ liegenden scharfen NH-Absorption (Abb. 16) der sich mit der Hydroxylabsorption überlappenden NH-Schwingung zuzuordnen sein.

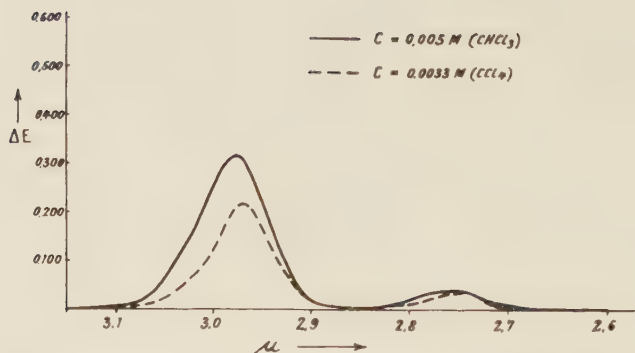
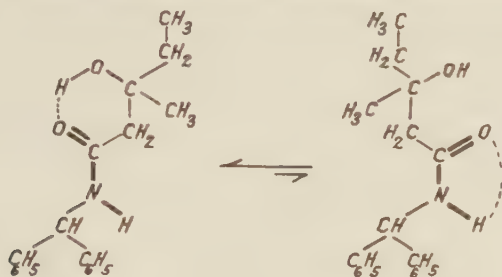


Abb.16 Absorptionsspektrum von 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäure-benzhydrylamid im Bereich der OH-Valenzschwingung.

Tabelle (V): IR-spektroskopische Daten für β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamid

Konz. (CCl ₄)	IR-Absorptionsmaxima					
	tert. OH (frei)			tert. OH (gebunden)		
	λ	$\bar{\nu}$	ϵ	λ	$\bar{\nu}$	ϵ
	2,788	3590	16,4	2,92	3425	86
0.005 M	2,788	3590	18,6	2,92	3425	86,4
0.0033 M						
Konz. (CHCl ₃)						
0.005 M	2,788	3590	23	2,925	3420	99,6
0.01 M	2,788	3590	19	2,925	3420	86

Für das β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid folgt aus Abb. 14 ein Gleichgewicht folgender Strukturen,



das der Intensität der "gebundenen" OH-Valenz nach zu urteilen, stark auf seiten der trans-Amid-Gruppierung mit der Möglichkeit zu intramolekularer H-Brückenbindung liegt.

In den Spektren des 5-O-Tetrahydropyranyl- und 5-O-Trityl-mevalonsäurebenzhydrylamids sind überhaupt keine Absorptionsmaxima mehr vorhanden, die man freien OH-Gruppen zuordnen kann. Das Spektrum des Tetrahydropyranyläthers zeigt in CCl_4 (Abb. 17) eine breite Bande mit drei Maxima, von denen wir die kürzerwelligen der intramolekular gebundenen tertiären OH-Gruppe, das längerwellige der NH-Schwingung zuordnen.

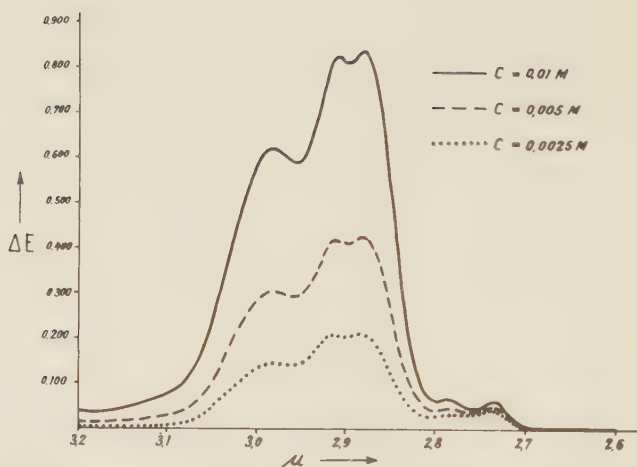
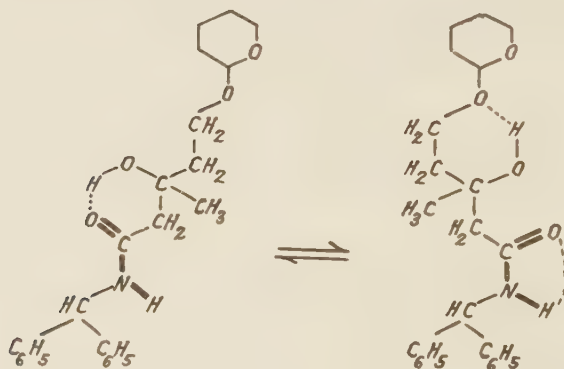


Abb.17 Absorptionsspektrum von 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäure-benzhydrylamid

Es kommt also nur ein Gleichgewicht folgender Strukturen in Betracht:



Ein analoges Gleichgewicht dürfte auch beim 5-O-Trityläther (Abb. 18) vorliegen.

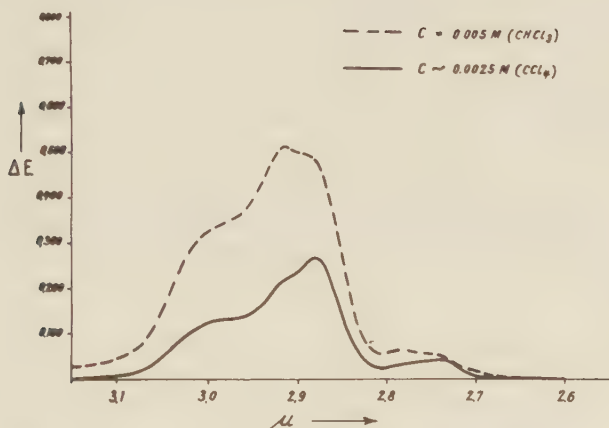


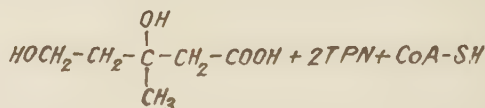
Abb. 18 Absorptionsspektrum von 5-O-Trityl-mevalonsäure-benzhydramid im OH-Valenzschwingungsbereich.

Die durch diese Beispiele bewiesene Beteiligung des Wasserstoffs der tertiären Hydroxylgruppe an einer intramolekularen H-Brückenbindung (in einer Sechseringstruktur mit einem Carbonyl- bzw. Äthersauerstoff) wird durch den Elektronendruck der am gleichen C-Atom sitzenden Methylgruppe verständlich, der die Abdissoziation des Protons erleichtert, diesem also sauren Charakter verleiht.

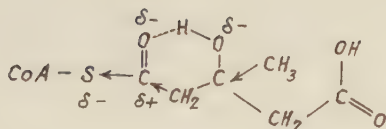
Da die gleiche Atomgruppierung im β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA vorliegt, besteht die Möglichkeit eines Einflusses dieser Gruppierung auf den Mechanismus der von Knappe und Lynen (11) studierten enzymatischen Reduktion von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA (XXIX) zur Mevalonsäure. Die ursprünglich als Zwischenprodukt dieser Reaktion vermutete β -Hydroxy- β -methyl-glutaraldehydsäure liess sich weder durch Zugabe von Semicarbazid zum Reaktionsansatz noch durch Isotopenverdünnungsversuche nachweisen (11), und scheint allenfalls in enzymgebundener Form aufzutreten. Die Reaktion verläuft stereospezifisch an einem einzigen Apoenzym unter Beteiligung von zwei Molekeln TPNH, die in zwei Schritten das Substrat unter CoA-Abspaltung zur Mevalonsäure reduzieren:



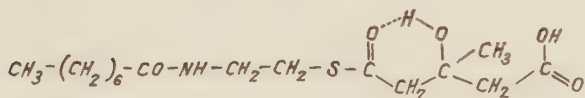
XXIX



Das β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA ist zur Ausbildung einer H-Brückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff der Thioester-Gruppierung und dem H-Atom der tertiären Hydroxylgruppe besonders geeignet. Die Polarisierung der unsymmetrisch substituierten C-S-Bindung in Richtung S-Atom und die daraus resultierende Ladungsverteilung (48) verleiht dem Carbonylsauerstoff einen besonders basischen, nukleophilen Charakter, die zum tertiären Hydroxyl α -ständige elektronenspendende Methylgruppe verstärkt andererseits die saure, elektrophile Natur des Hydroxyl-Protons:



Im Einklang mit diesen Überlegungen zeigt das Spektrum der OH-Schwingungsregion des analog gebauten S-(β -Hydroxy- β -methylglutaryl)-N-caprylcysteamins ¹⁾ (XXX) in CHCl_3 eine nach längeren



XXX

Wellenlängen verschobene "gebundene" OH-Valenzschwingung mit einem Maximum bei $2,87\mu$ (3484 cm^{-1} ; $\epsilon = 76$) (Abb. 19), die auch im vollständigen IR-Spektrum (Abb. 20, S. 54) als Schulter in der von der Amidgruppierung herrührenden NH-Bande ($\lambda_{\text{max.}} = 2,92\mu$; $\epsilon = 101$) zu sehen ist.

Beide Absorptionen sind verdünnungsunabhängig; eine Bande für "freies" Hydroxyl tritt nicht auf. Interessant ist ein Vergleich

¹⁾ Herrn Dr. H. Eggerer danke ich für die freundliche Überlassung einer Probe dieser Verbindung.

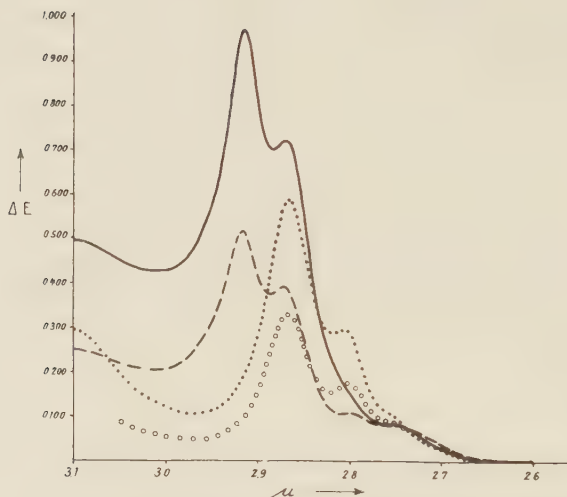
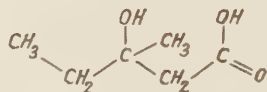


Abb. 19 Absorptionsspektren von S-(β-Hydroxy-β-methyl-glutaryl)-N-caprylcysteamin (— 0.01 M, - - - 0.005 M) und β-Hydroxy-β-methylvaleriansäure (..... 0.01 M, o o o o ~ 0.005 M)

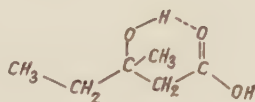
mit dem CHCl_3 -Spektrum der β-Hydroxy-β-methylvaleriansäure (XXXI), in der an Stelle der Thioester-Gruppierung eine endständige Methylgruppe tritt:



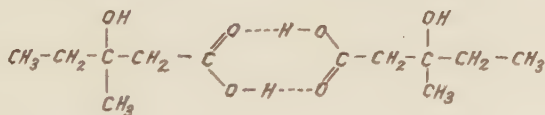
XXXI

Das konzentrationsunabhängige Hauptmaximum liegt bei der gleichen Wellenzahl (3484 cm^{-1} ; $2,87 \mu$), bei der im Spektrum des Cysteamin-

Derivates das Nebenmaximum liegt (Abb. 19), und dürfte aus diesem Grunde der gebundenen tertiären Hydroxylgruppe entsprechend folgender monomerer Struktur

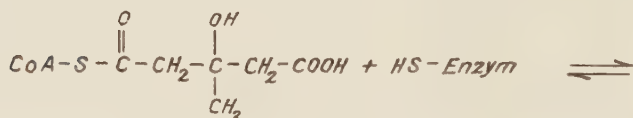


zuzuordnen sein. Das Nebenmaximum bei $2,80\mu$ (3571 cm^{-1}) könnte von der freien OH-Valenzschwingung der Carboxylgruppe herrühren, lässt sich aber auch auf freies tertiäres Hydroxyl zurückführen. Merkwürdig ist die Aufspaltung der $\text{C}=\text{O}$ -Valenz in zwei Absorptionsmaxima bei $5,78\mu$ (1730 cm^{-1}) und $5,88\mu$ (1700 cm^{-1}) bei einer Konzentration von 1 mg/ccm (3 mm Schichtdicke). Möglicherweise liegt bei dieser Konzentration ein Gemisch der monomeren und dimeren Form vor (Abb. 20), während bei höheren Konzentrationen die dimere Form dominiert:

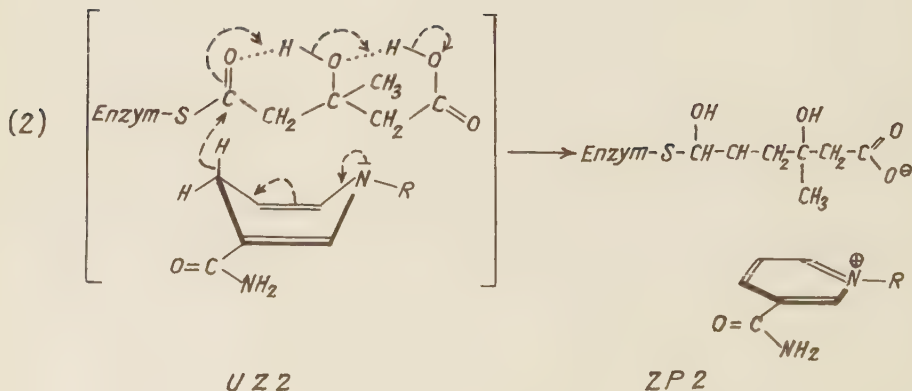
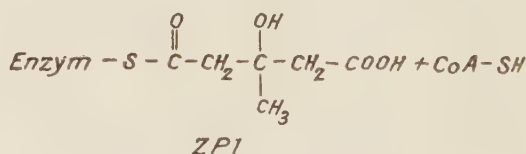


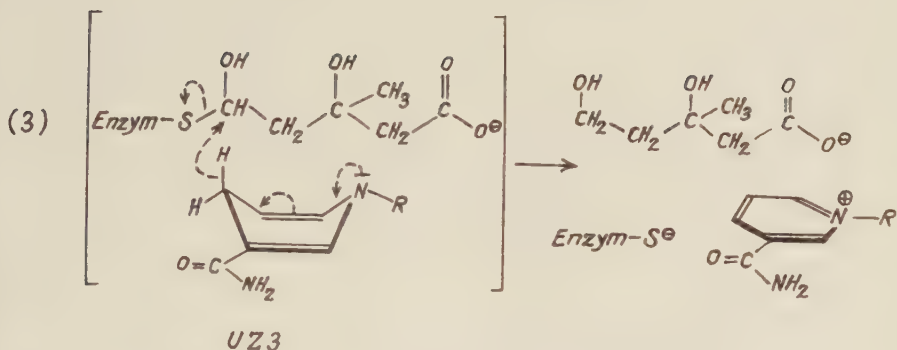
Als Ergebnis dieser Messungen können wir mit Sicherheit eine Beteiligung der tertiären Hydroxylgruppe an einer H-Brückenbindung mit einer Carbonylgruppe der besprochenen Molekeln annehmen, was wahrscheinlich nicht ohne Bedeutung für den Mechanismus der enzymatischen Reduktion von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA ist. Wie Lynen und Knappe durch Hemmversuche mit Jodacetamid fanden, ist eine SH-Gruppe des Enzyms für dessen katalytische Wirksamkeit notwendig, was zusammen mit der bei Zusatz von CoA beobachteten Hemmung der Reaktion (12) für eine einleitende "Umesterung" des β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA zu β -Hydroxy-

- β -methyl-glutaryl-S-Enzym spricht. Da diese "Umesterung" eine Gleichgewichtsreaktion ist und unter Freisetzung von CoA verläuft, erklärt sich die Hemmwirkung des letzteren durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zu ungunsten der Enzym-Substrat-Verbindung. Im Übergangszustand der beiden unter direkter stereospezifischer Hydridion-Übertragung verlaufenden Reduktionsschritte (49) liegt jeweils ein ternärer Enzym-Substrat-Coenzym-Komplex vor, der die im UZ 2 unter simultaner Elektronenverschiebung formulierte Bildung eines resonanzstabilisierten enzymgebundenen Carboxylat-Ions begünstigen dürfte und im UZ 3 die Spaltung der Halbmercaptopal-Bindung unter Freisetzung von HS-Enzym bewirkt:



(1)





Durch die Bindung des Substrats an das Enzym wird 1. der beobachtete stereospezifische Verlauf der Reduktionen gewährleistet, da der nukleophile Angriff des Coenzym in beiden Fällen von der gleichen Seite her erfolgen muss, und folglich nur das (S)- β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA zu (R) (+)-Mevalonat reduziert wird; 2. im UZ 2 eine simultan verlaufende "push-pull"-Reaktion erleichtert, die auf der gleichzeitigen Wirkung basischer (Dihydropyridinstickstoff, Hydrid-Ion) und saurer Gruppen (Hydroxylwasserstoff) beruht und ohne Beteiligung von Lösungsmittelmolekülen bei den Protonenübertragungen direkt zum resonanzstabilisierten Carboxylat-Zwischenprodukt führt. Die Bedingungen für Reaktionen dieser Art dürften in strukturierten Enzym-Substrat-Komplexen eher gegeben sein als in homogenen Lösungen (vgl. 50). Der vorgeschlagene Mechanismus gewinnt unserer Meinung nach an Wahrscheinlichkeit durch die angedeuteten Wasserstoffbrückenbindungen, für deren Vorhandensein die IR-Spektren der Modellssubstanzen sprechen.

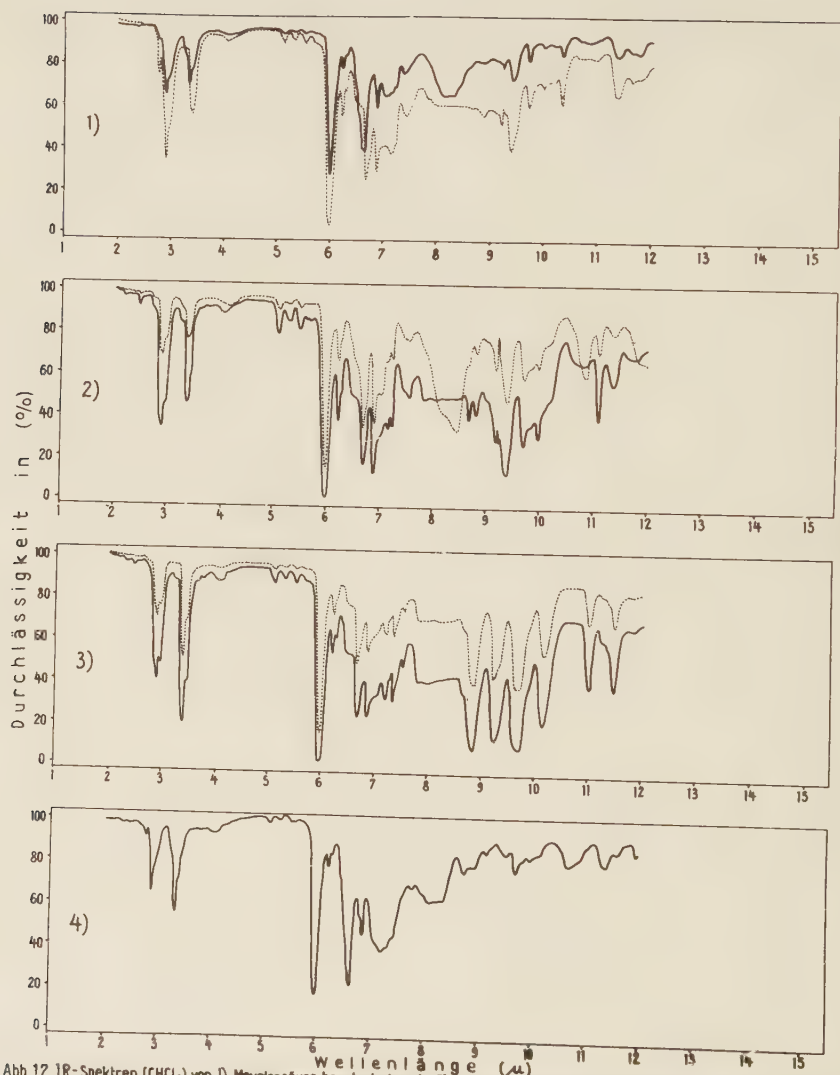


Abb. 12 IR-Spektren (CHCl_3) von 1) Mevalonsäure benzhydrolamid. 3) 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäure benzhydrolamid.
2) 5-O-Trityl-mevalonsäure benzhydrolamid. 4) β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäure benzhydrolamid.

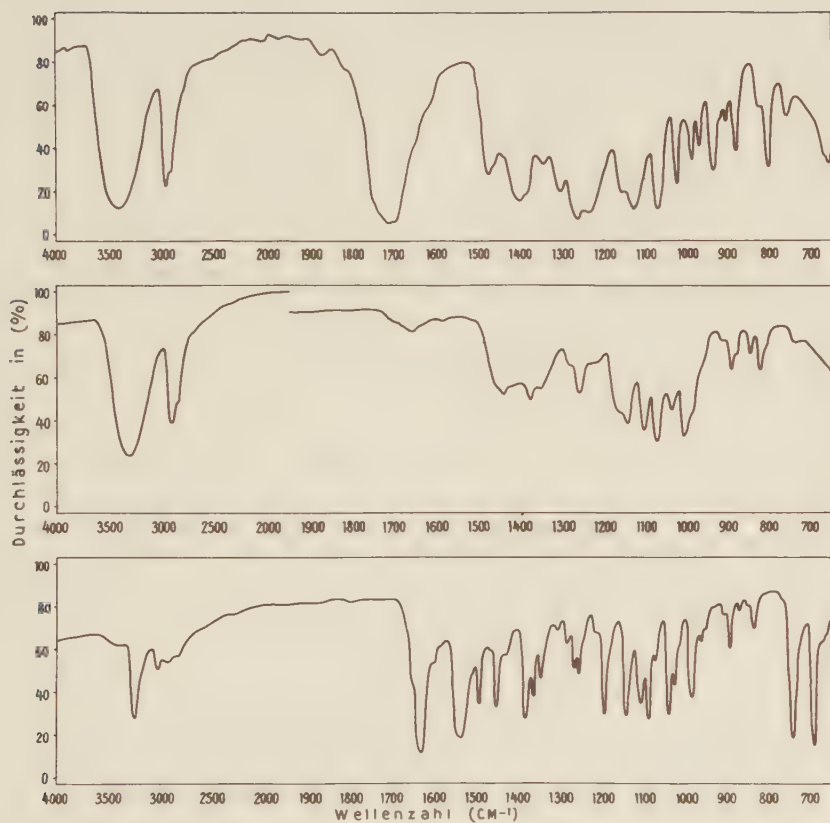
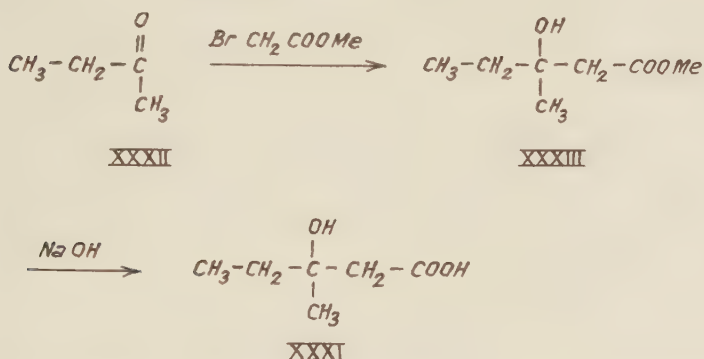


Abb. 13 IR-Spektren von 1) Mevalonsäurelacton (Film) 2) Hemiacetal (Film)
3) 3,5-D-Benzyliiden-mevalonsäure benzhydrylamid (KBr)

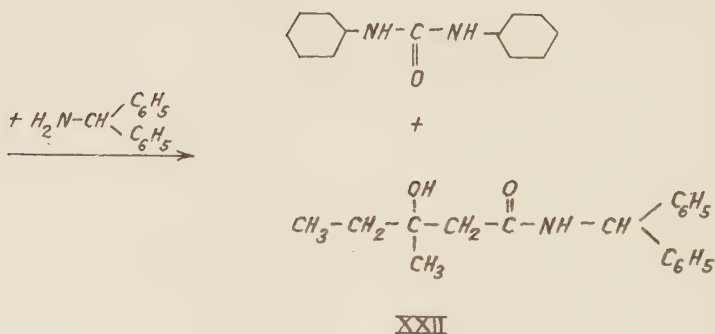
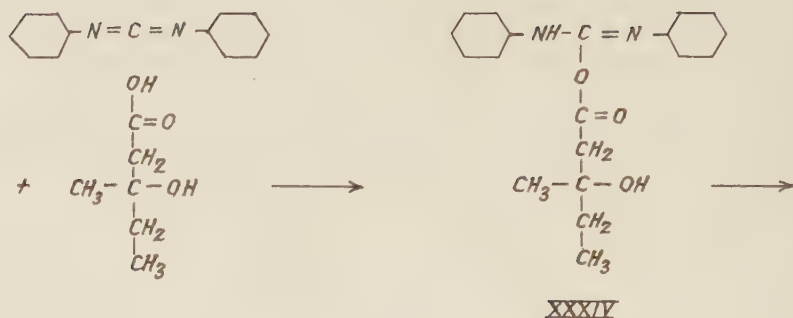
Synthese von β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid

Die Herstellung der β -Hydroxy- β -methylvaleriansäure (XXXI) aus Äthylbromacetat und Methyläthylketon (XXXII) durch Reformatsky-Reaktion in Gegenwart von Mg und Verseifung des entstandenen Äthylesters wurde bereits von Kon und Linstead (51) erwähnt. Da die Autoren keine näheren Angaben machen, beschreiben wir die von uns modifizierte Synthese der β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäure im experimentellen Teil:



Das gewünschte β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamid (XXII) konnte aus der freien Säure mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid als kondensierendem Reagens in Anlehnung an die von Sheehan et al. (52) und Khorana (53) mit Dicyclohexylcarbodiimid ausgeführten Peptidsynthesen gewonnen werden.

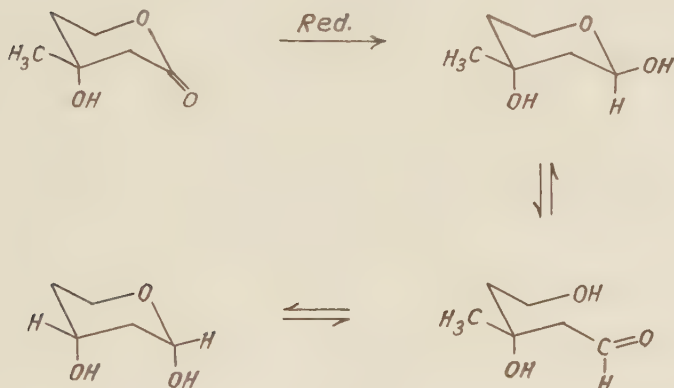
In dieser eleganten, momentan bei Zimmertemperatur verlaufenden Reaktion addiert sich die Carboxylgruppe der β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäure an das Carbodiimid unter Bildung eines O-Acylisoharnstoffs (XXXIV), der als energiereiche Verbindung von der Aminogruppe des Benzhydrylamins unter Amid-Bildung gespalten wird:



Die anfängliche Verwendung von Dimethylformamid als Lösungsmittel erwies sich als ungünstig, da hierbei ein grosser Teil des gebildeten Dicyclohexylharnstoffs in Lösung bleibt und nur schwer vom Amid abgetrennt werden kann. Wir führten daher die Reaktion in möglichst wenig Methylenchlorid aus, in dem wir die Komponenten in Methylenchlorid gelöst zusammengaben, wobei unter Wärmeentwicklung sofort Dicyclohexylharnstoff ausfiel, der nach 5-stündigem Rühren bei Raumtemperatur abfiltriert wurde.

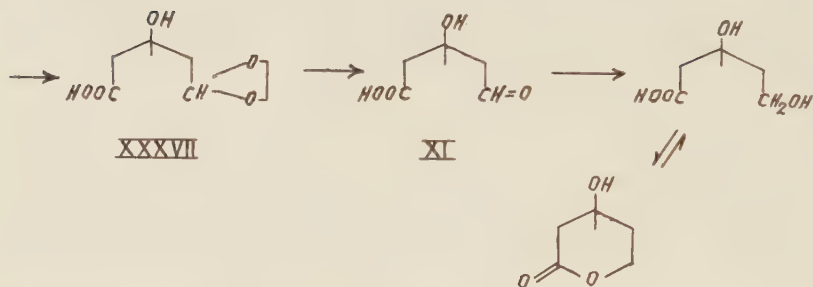
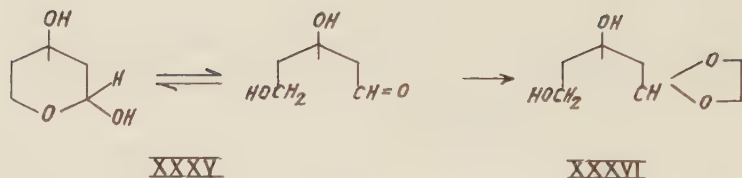
Reduktion von Mevalonsäurelacton

Zur Lösung des Problems der chemischen Konfigurationsumkehr der Mevalonsäure schwebte uns nach der Undurchführbarkeit der alkalischen Hydrolyse 5-O-substituierter Mevalonsäurebenzhydrylamide die Reduktion des Mevalonsäurelactons zum Hemiacetal (XXXV) vor. Wir nahmen an, dass in Analogie zu den cyclischen Halbacetalen der Zuckerreihe ein Gleichgewicht zwischen dem offenkettigen Hydroxyaldehyd und den diastereomeren cyclischen Halbacetalformen besteht (vgl. Mutarotation der Glucose):

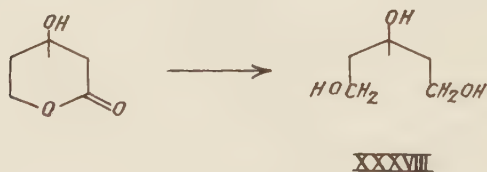


XXXV

und hofften durch Ketalisierung der Aldehyd-Gruppe zum offenkettigen Ketal (XXXVI) zu gelangen. Mit alkalischen Permanganat sollte sich dieses zur Ketalsäure (XXXVII) oxydieren lassen. Saure Ketalsspaltung und Nachreduktion mit KBH_4 würde dann zur Mevalonsäure führen.



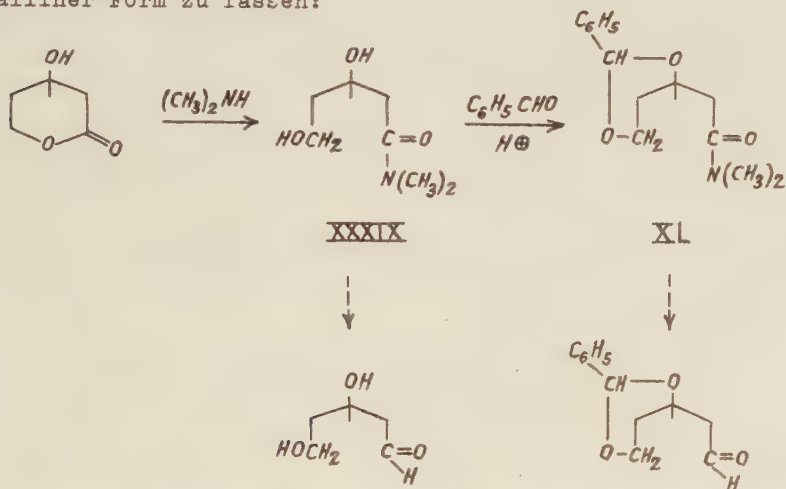
Da die direkte Reduktion des Mevalonsäurelactons mit LiAlH_4 unter Öffnung des Lactonringes zum Triol (XXXVIII) verläuft (54),



suchten wir nach einer Methode, die das Abfangen des Reduktionsproduktes auf der Aldehydstufe ermöglicht.

Das von H.C. Brown (55) entwickelte Verfahren der Reduktion von N,N-Dimethylcarboxamiden zu Aldehyden mit Lithium-diäthoxyaluminiumhydrid schien uns dafür geeignet. Als erste Aufgabe war damit die Herstellung des Mevalonsäure-dimethylamids gegeben.

Zu diesem Zweck gaben wir in einer Kühlfalle bei -70° verflüssigtes Dimethylamin (freigesetzt aus Dimethylamin-hydrochlorid durch Zutropfen 10 n KOH) in einem Druckkolben mit Mevalonsäurelacton zusammen und hielten den gut verschlossenen Kolben mehrere Tage im Thermostaten bei 40° . Nach dem Entfernen überschüssigen Dimethylamins am Vak. unter leichtem Erwärmen, versuchten wir das Dimethylamid (XXXIX) als 3,5-O-Benzyliden-Derivat (XL) in kristalliner Form zu fassen:



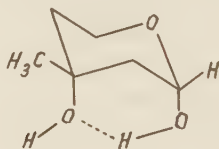
Da dies nicht gelang und in den Reaktionsansätzen papierelektrophoretisch unverändertes Mevalonsäurelacton als freie Säure im Pyridin-Acetatpuffer von pH 6.2 nachgewiesen wurde, nehmen wir eine unter den Reaktionsbedingungen zur Lactonöffnung nicht ausreichende Basizität des Amins an. Da mit der Methode von H.C. Brown nur Dimethylamide zu Aldehyden reduziert werden können (die Reduktion von Mevalonsäurebenzhydrylamid auf diese Weise lieferte unverändertes Ausgangsprodukt zurück), reduzierten wir Mevalonsäurelacton direkt mit der berechneten Menge Lithium-diäthoxyaluminiumhydrid zum Hemiacetal (XXXV).

Das bei $100 - 105^{\circ}$ (0.06 mm) übergehende fast farblose zähflüssige Reaktionsprodukt zeigte das für Acetale typische IR-Spektrum (Abb. 13, S. 53) mit den der Gruppierung (C-O-CH-O-H) zuzuschrei-

benden Banden. Auffallend ist ferner das vollständige Fehlen der $C = O$ -Valenzschwingung sowie die stark ausgeprägte Hydroxylbande. Die mässige Ausbeute (51 %) und der beträchtliche Destillationsrückstand (1,06 g bei 5,4 g Ausgangsprodukt) sprechen für einen uneinheitlichen Verlauf der Reaktion unter Entstehung des nicht destillierbaren Triols (XXXIX) als Nebenprodukt. Wegen der geringen erhaltenen Hemiacetalmenge war eine scharfe Fraktionierung am Hochvakuum nicht möglich; das bei $100 - 105^{\circ}$ (0.06 mm) übergehende Öl gab folglich eine ungenaue C, H-Analyse (Ber. C 54,5 %; H 9,1 %; Gef. C 56,11 %; H 9,61 %).

Das Fehlen der $C = O$ -Valenz im IR-Spektrum spricht für eine vollständige Verschiebung des Gleichgewichts (XXXV) auf die Seite der cyclischen Halbacetalform. Dieser Befund stimmt mit der auf Seite 33 erwähnten Gleichgewichtslage im Tetrahydropyran-2-ol überein, das in CCl_4 nur zu 4 % in der offenkettigen 5-Hydroxypentanal-Struktur vorliegt (41).

Betrachtet man die beiden diastereomeren Sesselkonformationen des Hemiacetals, so fällt die Möglichkeit zur Ausbildung eines H-Brücken-Sechsrings in dem Diastereomeren auf, in dem die beiden Hydroxylgruppen axial orientiert sind:



Dass diese Konformation im Diastereomerengleichgewicht wirklich in beträchtlichem Ausmass vorliegt, liess sich durch Messung der Hydroxylfrequenzen in CCl_4 (ca. 0.0025 M Konz.) mit dem Beckman-Spektrophotometer nachweisen. Das Spektrum zeigt ein scharfes Absorptionsmaximum bei $\lambda = 2,79\mu$ (3585 cm^{-1}), das wir der freien äquatorial gerichteten Hydroxylgruppe zuschreiben, und ein breites Maximum bei $2,94\mu$ (3400 cm^{-1}), das der axial orientierten

gebundenen Hydroxylgruppe zuzuordnen ist. Diese Möglichkeit zur Ausbildung eines H-Brücken-Sechsrings trägt sicherlich zur Stabilisierung der cyclischen Halbacetalstruktur gegenüber der offenkettigen Hydroxyaldehydform bei.

Zu dem gleichen Schluss berechtigt die ausserordentlich erschwerte 2,4-Dinitrophenylhydrazonbildung aus dem Hemiactal, die in verschwindender Ausbeute ($\sim 1\%$) ein tiefrotes Hydrazon lieferte, das durch Chromatographie an 15 g basischem Al_2O_3 (Woelm, Aktivitätsstufe I; aufgetragen und eluiert mit Benzol) gereinigt und aus Essigester-Petroläther zur Kristallisation gebracht wurde (Smp. $125 - 130^\circ$). Da mehrmaliges Umkristallisieren zu keinem schärferen Schmelzpunkt führte, verzichteten wir auf eine C,H-Analyse.

Die Kinetik der Dinitrophenylhydrazonbildung zeigte (sogar bei $T = 60^\circ$) einen ungewöhnlich langsamen Reaktionsverlauf (Abb. 21).

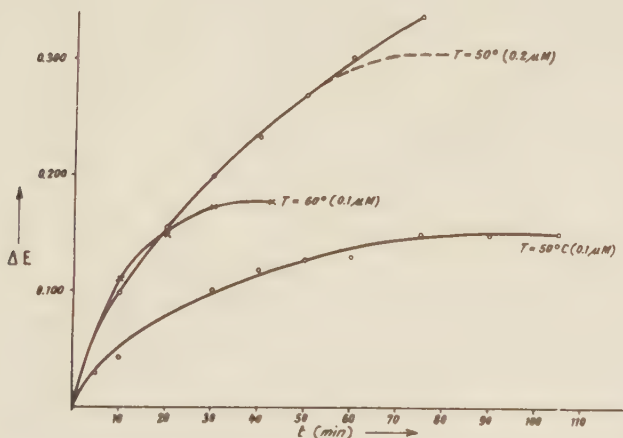
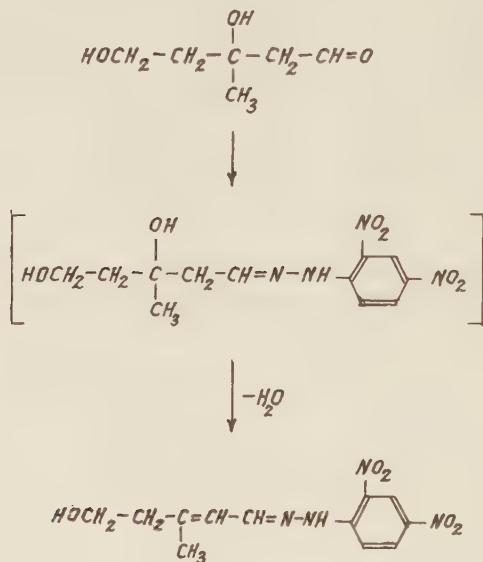


Abb. 21 Kinetik der 2,4-Dinitrophenylhydrazonbildung aus Hemiactal

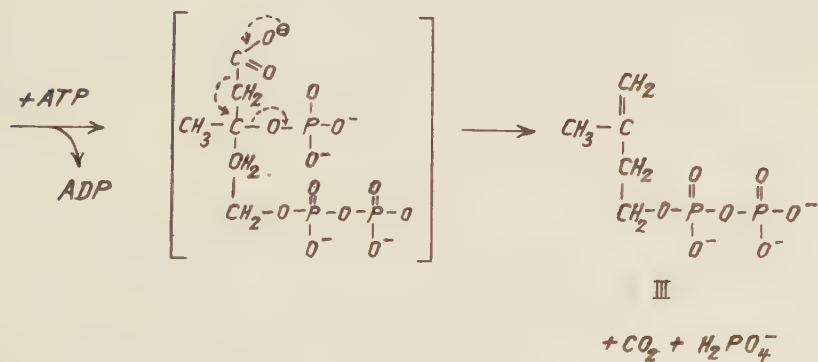
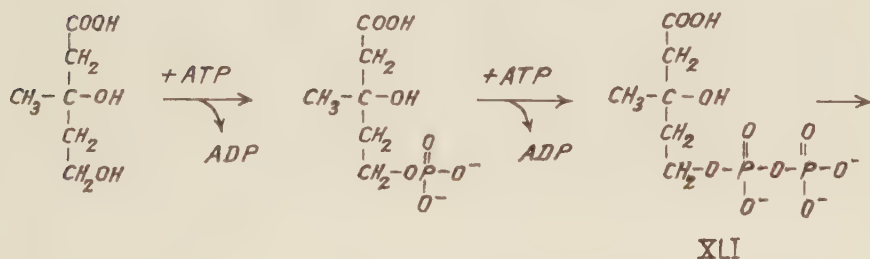
Die Isolierung des tiefroten Dinitrophenylhydrazons und die Befunde von Eggerer (21), nach denen das Dinitrophenylhydrazon der β -Hydroxy- β -methyl-glutaraldehydsäure nur in der dehydratisierten, α,β -ungesättigten Form isoliert werden kann, sprechen für eine, der Dinitrophenylhydrazonbildung parallel laufende Dehydratisierung des 3,5-Dihydroxy-3-methyl-pentanal (XXXV) in 2 n HCl:



In Übereinstimmung mit der geringen, stark verzögerten Dinitrophenylhydrazonbildung ($0.1 \mu\text{M}$ Hemiacetal gaben unter den Testbedingungen bei 50° nach 75 Min. Inkubation $\Delta E_{546\text{m}\mu} = 0.150$, während $0.1 \mu\text{M}$ Benzaldehyd im gleichen Test bei Raumtemperatur $\Delta E_{546\text{m}\mu} = 0.550$ verursachen), gelang es nicht, das Hemiacetal nach der Methode von Reichstein und Mitarb. (56) mittels Äthylenglykol und katalytischen Mengen p-Toluolsulfosäure in das Ketal (XXXVI) zu überführen.

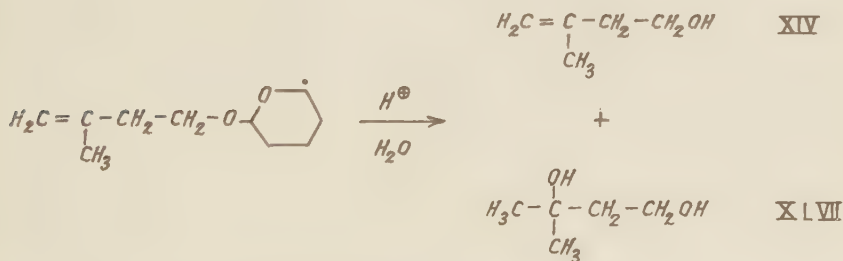
III. Synthese von Δ^3 -Isopentenol

Im Rahmen der Untersuchungen über die enzymatische Synthese des Squalens aus Mevalonsäure konnte von den Arbeitsgruppen um Lynen (6, 57) und Bloch (7) die aktive zu Squalen kondensierende "Isopren"-einheit als Δ^3 -Isopentenylpyrophosphat (III) identifiziert werden. Die Versuche zeigten, dass 3 Moleküle ATP für die Umwandlung von 1 Molekül Mevalonsäure in ein Molekül Isopentenylpyrophosphat benötigt werden. In zwei enzymatischen Schritten wird Mevalonsäure in Mevalonsäurepyrophosphat (XLI) überführt und dieses unter gleichzeitiger Eliminierung der tertiären OH- oder OR-Gruppe enzymatisch zu Δ^3 -Isopentenylpyrophosphat decarboxyliert (58):



das sofort in Triphenylphosphinoxid (XLV) und Olefin zerfällt.

Wir führten die eigentliche Olefinierungsreaktion in einem mit Tropftrichter, Rührer und Rückflusskühler versehenen Dreihalskolben durch, wobei der Tropftrichter mit einem seitlichen Ansatz für die Stickstoffeinleitung versehen war. Bei der Zugabe von 1-Tetrahydropyranyl-3-butanon (XLIII) zu der im Überschuss vorliegenden ätherischen Triphenylphosphinmethylenlösung fiel schlagartig das Betain (XLIV) aus, das nach Ersatz des Äthers durch Tetrahydrofuran und Erhitzen des Reaktionsgemisches wieder in Lösung ging. Die gewünschte Methylenverbindung (XLVI) konnte bei der Aufarbeitung in einer Ausbeute von 72 % isoliert und durch ihr IR-Spektrum identifiziert werden (Abb. 22). Charakteristisch ist die (C = C)-Valenzschwingung bei $6,1\mu$ und das Fehlen der C = O-Absorption, was für vollständigen Reaktionsablauf spricht. Das freie Δ^3 -Isopentenol (XIV) wurde aus dem Tetrahydropyranyläther (XLVI) durch saure Hydrolyse in 43 proz. Ausbeute gewonnen, wobei als Nebenprodukt unter Absättigung der Doppelbindung 3-Methylbutandiol-(1,3) (XLVII) entsteht:



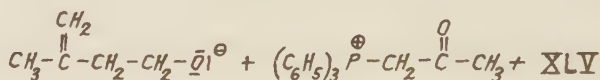
Das durch Fraktionierung gewonnene reine Isopentenol wurde durch sein IR-Spektrum, Überführung in das kristalline 3,5-Dinitrobenzoat und papierchromatographischen Vergleich mit einem authentischen Dinitrobenzoat identifiziert.

Wegen der unbefriedigenden Ausbeute infolge Absättigung der Doppelbindung bei der Ätherspaltung versuchten wir auch durch Carbonyl-Olefinierung des 4-Acetoxy-2-butanons (XLVIII) zum Isopentenol zu gelangen.

Auf Grund der Erfahrungen Sondheimers (60) bei der Olefinierung des 3-Acetoxy-7-ketocholesterins nahmen wir an, dass die Acetyl-Gruppe während der Umsetzung durch das Ylid abgespalten wird:



XLVIII



Es wurde daher ein etwa 4-facher Überschuss an Triphenylphosphinmethylen verwendet. Als Base für die Herstellung des Ylids in diesem Falle eine ätherische Lösung von Phenyl-Lithium (1,19 M). Bei der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes liess sich jedoch kein Isopentenol isolieren, auch nicht nach Hydrolyse des Reaktionsproduktes mit 1 n wässriger methanolischer KOH.

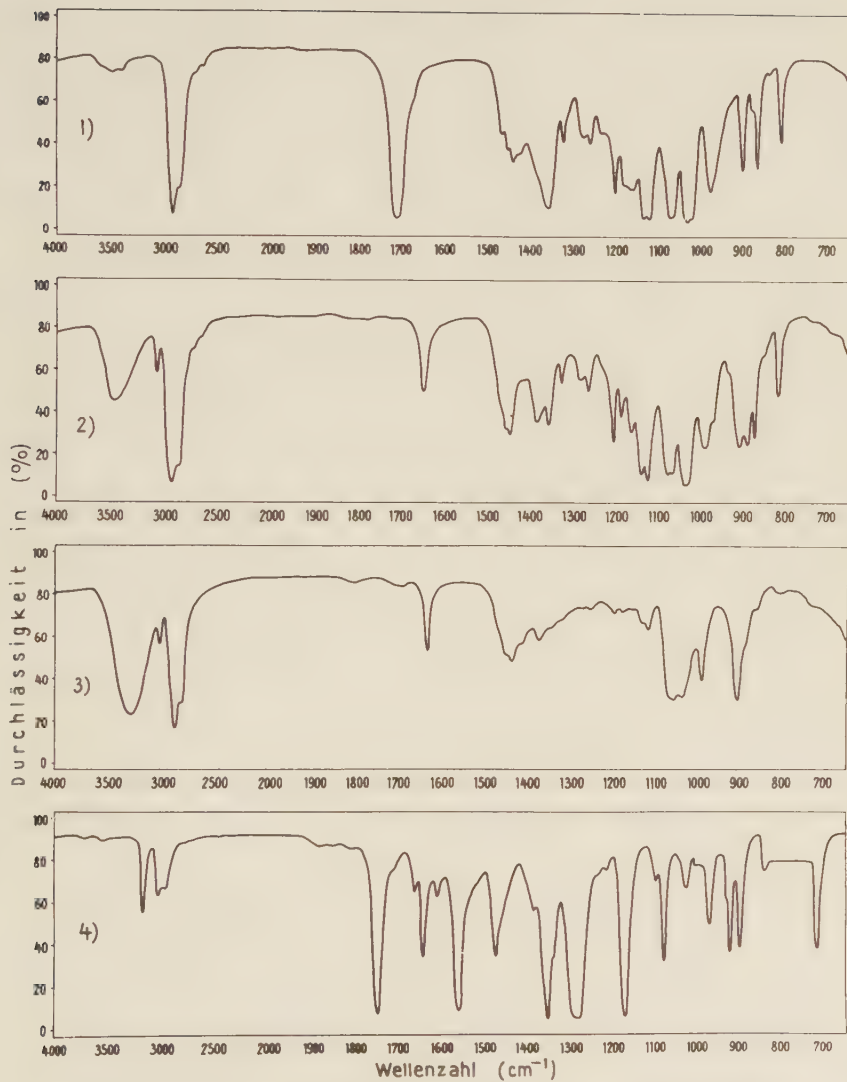


Abb. 22 IR-Spektren von (1) 1-Tetrahydropyranyl-3-butanon (3) Δ^3 -Isopentenol
(2) 1-Tetrahydropyranyl-3-methyl-3-buten (4) 3,5-Dinitrobenzoat von Δ^3 -Isopentenol

IV. Zusammenfassung

1. Die enzymatische Reduktion von synthetischer ($\pm$)- β -Hydroxy- β -methyl-glutaraldehydsäure zu Mevalonsäure durch plasmolysierte Zellpräparate aus Bäckerhefe und Isolierung der gebildeten Mevalonsäure durch chromatographische Reinigungsmethoden, führte zu einem Produkt, das nur zu 75 % aus biologisch aktiver (R) (-)-Mevalonsäure bestand. Nach Inkubation mit der stereospezifisch nur (+)-Mevalonsäure phosphorylierenden Mevalonatkinase aus Hefe und Abtrennung der gebildeten ätherunlöslichen (+)-5-Phosphomevalonsäure vom restlichen sauren ätherlöslichen Reaktionsprodukt, gelang die Identifizierung des letzteren als (S) (-)-Mevalonat. Kinetische Messungen des Aldehydsäure-Verbrauches mit der kolorimetrischen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Methode (22), für die wir ausser den Hefezellsuspensionen auch zellfreie Enzymlösungen mit Mevalonsäuredehydrogenase-Aktivität verwendeten, zeigten, dass bei genügend langer Inkubationsdauer die gesamte eingesetzte ($\pm$)-Aldehydsäure zu Mevalonsäure reduziert wird. Wir schliessen aus diesem Befund auf das Zusammenwirken zweier verschiedener enzymatischer Effekte, der rasch verlaufenden stereospezifischen Reduktion von (R) (+)-Aldehydsäure zu (R) (+)-Mevalonsäure durch die TPNH-spezifische Mevalonsäuredehydrogenase und einer langsamer verlaufenden Reduktion von (S) (-)-Aldehydsäure zu (S) (-)-Mevalonsäure durch unspezifisch wirkende, in der Hefe vorhandene Alkohol-Dehydrogenasen. Das Vorhandensein einer Mevalonsäure-Racemase kann auf Grund der kinetischen Befunde ausgeschlossen werden.
2. Mit dem Ziel, die durch bakterielle Racematspaltung von Lynen und Grassl (19) dargestellte (S) (-)-Mevalonsäure in biologisch aktive (R) (+)-Mevalonsäure auf präparativem Wege zu überführen, stellten wir 5-O- bzw. 3,5-O-substituierte Mevalonsäure-benzhydrylamide her und hofften durch alkalische Hydrolyse die Carboxyl-Gruppe für einen reduktiven Angriff freizulegen. Wie wir fanden, lassen

sich 5-O-Tetrahydropyranyl-, 5-O-Trityl- und 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamid im Gegensatz zum unsubstituierten Mevalonsäurebenzhydrylamid alkalisch nicht verseifen. Dies legte den Gedanken einer wesentlichen Beschleunigung der Hydrolyse von Mevalonsäurebenzhydrylamid durch intramolekularen Angriff der als Alkoholat-Ion vorliegenden primären Hydroxylgruppe auf den Carbonylkohlenstoff der Amidbindung unter Bildung eines cyclischen Zwischenprodukts nahe, das rasch in Mevalonsäurelacton und Benzhydrylamin zerfällt. Um diesen Mechanismus zu beweisen, synthetisierten wir das völlig gleich gebaute, aber an Stelle der primären Hydroxylgruppe ein H-Atom tragende β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid durch Kondensation von β -Hydroxy- β -methylvaleriansäure und Benzhydrylamin mittels Dicyclohexylcarbodiimid und studierten sein Verhalten bei der alkalischen Hydrolyse. Unter Bedingungen, bei denen Mevalonsäurebenzhydrylamid vollständig hydrolysiert wurde, sowie unter wesentlich stärkeren Reaktionsbedingungen liess sich das β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid quantitativ aus dem Hydrolyseansatz zurückgewinnen.

3. Quantitative Messungen der IR-Absorptionen der von uns hergestellten Mevalonsäurebenzhydrylamide im Bereich der OH-Valenzschwingung führten zu interessanten Feststellungen über die Struktur dieser Verbindungen in flüssiger Phase. Aus der anomalen verdünnungsunabhängigen Verschiebung der Hydroxylschwingung in den längerwelligen Bereich und der breiten, meistens mehrere Absorptionsmaxima aufweisenden Form der Bande schliessen wir auf das Vorliegen intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der tertiären Hydroxyl- und der Amid-Carbonylgruppe. Durch die Ausbildung eines solchen H-Brückensechsrings wird die thermodynamisch günstigere trans-Amidkonfiguration zusätzlich stabilisiert und das Gleichgewicht zwischen trans- und cis-Konfiguration stärker auf die Seite der

trans-Struktur verschoben. In Übereinstimmung damit zeigt das Spektrum des β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäure-benzhydrylamids eine intensive Bande für "gebundenes" Hydroxyl und eine sehr schwache für "freies" Hydroxyl.

Um Irrtümer auszuschliessen, wurde die Lage der reinen Amid-NH-Schwingung und der freien OH-Bande durch Vergleichsspektren festgelegt.

Eine grundsätzlich ähnliche, zur Ausbildung eines Wasserstoffbrückensechsrings zwischen der tertiären Hydroxyl- und der Thioester-Carbonylgruppe befähigte Struktur liegt im β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA vor. Möglicherweise kommt dieser Anordnung der Reaktionszentren für den Mechanismus der enzymatischen Reduktion von β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA zu Mevalonsäure Bedeutung zu. Wir untersuchten daher die IR-Absorptionen von S-(β -Hydroxy- β -methylglutaryl)-N-caprylcysteamin und β -Hydroxy- β -methylvaleriansäure und diskutieren auf Grund der nachgewiesenen H-Brückenstrukturen und der Befunde von Lynen und Knappe (11) einen plausiblen Reaktionsmechanismus.

4. In Fortsetzung der Versuche zur Konfigurationsumkehr der Mevalonsäure, wandten wir uns der direkten Reduktion des Mevalonsäurelactons zum entsprechenden Hemiacetal zu. Dieses liess sich wegen der vollständigen, aus dem IR-Spektrum hervorgehenden Verschiebung des Diastereomerengleichgewichts auf die Seite der cyclischen Halbacetalformen nicht in der offenen Hydroxyaldehydform durch Ketalisierung der Aldehydgruppe fixieren, so dass dieses Konzept der Konfigurationsumkehr aufgegeben werden musste.
5. Für die Synthese des dem biologisch wichtigen Δ^3 -Isopentenylpyrophosphat zugrunde liegenden Alkohols Δ^3 -Isopentenol arbeiteten wir eine einfache Reaktionsfolge aus, die sich der Wittig'schen Methode der Carbonyl-Olefinierung bedient und vom leicht zugänglichen 3-Ketobutanol

ausgeht. Da für den glatten Ablauf der Olefinierungsreaktion Schutz der primären Hydroxylgruppe notwendig ist, die guten Ausbeuten im Olefinierungsschritt aber durch Verluste bei der Abspaltung des als Schutzgruppe verwendeten Tetrahydropyranylrestes ausgeglichen werden, ist diese Synthese zur Herstellung radioaktiv markierten Δ^3 -Isopentenols nicht in gleicher Weise geeignet wie die von Eggerer (57) ausgearbeitete Synthese; immerhin besteht die Möglichkeit zur Einführung einer radioaktiv markierten Methylengruppe auf diesem Wege.

Für zahlreiche wertvolle Anregungen und Diskussionen möchte ich Herrn Dr. H. Eggerer, für seine unermüdliche Hilfe bei der Diskussion der IR-Spektren Herrn Dr. E. Biekert (Max Planck-Institut für Biochemie, München) herzlich danken.

C Experimenteller Teil

I. Enzymatische Synthese biologisch aktiver Mevalonsäure aus (+)- β -Hydroxy- β -methyl-glutaraldehydsäure

1. Teste

- a) 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Test (kolorimetrische Bestimmung von Aldehydsäure)

Zu 2 ml Testlösung gibt man 0,5 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung ($5 \mu\text{M}$ pro ml 2 n HCl), inkubiert das Gemisch 5 Min. bei Raumtemperatur und versetzt dann mit 3,0 ml 2,5 n NaOH. Nach weiteren 5 Min. bestimmt man die Extinktion der Lösung in einer 1 cm-Glasküvette bei $\lambda = 546 \text{ m}\mu$ im Photometer "Eppendorf" gegen eine Vergleichsküvette, die an Stelle der Testlösung Wasser enthält. Die ΔE -Werte werden an Hand einer Eichkurve ausgewertet, die mit einer 0.1 M Aldehydsäure-Stammlösung (pH 7.0) gewonnen wurde.

0.1 μM (+)-Aldehydsäure bewirken $\Delta E_{546 \text{ m}} = 0.170$.

- b) Hydroxamsäure-Test (kolorimetrische Bestimmung von Mevalonsäurelacton)

0,2 ml Mevalonsäurelacton-Lösung werden mit 0,8 ml 2 M NH_2OH , pH 7.2 (durch Mischen gleicher Teile 4 M $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ und 4 M KOH vor Gebrauch bereitet), versetzt und 45 Min. bei 37° inkubiert.

Man kühlt die Hydroxamsäureproben darauf mit Eiswasser, gibt 1,3 ml FeCl_3 -Lösung (hergestellt aus gleichen Teilen 12 % Trichloressigsäure, 5 % FeCl_3 -Lösung in 0.1 n HCl und 3 n HCl) hinzu, schüttelt zur Vertreibung der Gasbläschen kräftig um und bestimmt die Extinktion

der Lösung nach 2 Min. bei $\lambda = 546 \text{ m}\mu$ in einer 1 cm-Glas-
küvette gegen eine Vergleichsküvette ohne Mevalonsäurelacton.
Die Auswertung der ΔE -Werte erfolgt an Hand einer Eichkurve
(Abb. 4).

1 μM Mevalonsäurelacton bewirken $\Delta E_{546} = 0.243$.

c) Mevalonatkinase-Test (photometrische Bestimmung von
(+)-Mevalonat)

In einer 1 cm-Messküvette befinden sich in einem Gesamtvolumen
von 1,9 ml:

340 μM Triäthanolamin-HCl-Puffer (pH 7,45)

160 μM KCl

40 μM MgSO_4

1 mg Serumalbumin (Behringwerke Marburg)

1 μM K_3 -Phosphoenolpyruvat

0,6 μM DPNH

25 γ Lactatdehydrogenase (LDH)

2 μM ATP

10 γ Pyruvatkinase (PK)

} Boehringer & Söhne,
Mannheim

ca. 50 γ Mevalonatkinase (MVK)

und die zu bestimmende K-Mevalonat-Lösung.

Die Reaktion wird nach Ablauf der DPNH-Oxydation, die auf
Kosten der im Phosphoenolpyruvat vorliegenden Brenztrauben-
säure und des im ATP vorhandenen ADP stattfindet, durch Zu-
satz der Mevalonat-Lösung gestartet, und die Extinktions-
abnahme bei 366 $\text{m}\mu$ und $T = 20^\circ$ gegen eine Vergleichsküvette
ohne Mevalonat bis zum Stillstand der Reaktion verfolgt.

Der (+)-Mevalonsäure-Gehalt der Testlösung berechnet sich
nach der Formel:

$$\Delta c = \frac{\Delta E_{366} \cdot v}{\text{DPNH}}$$

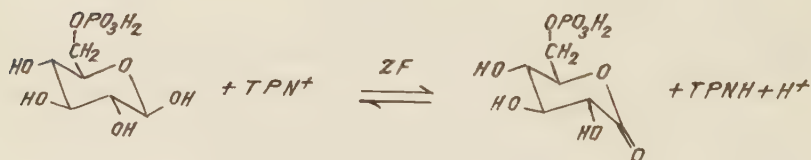
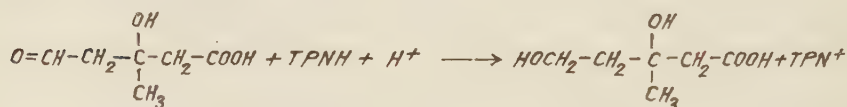
ΔE : Differenz zwischen Anfangs- und Endextinktion des DPNH bei 366 m

V: Volumen des Testansatzes (1,90 ml)

ϵ_{DPNH} : molarer Extinktionskoeffizient von DPNH
($3.3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$)

d) Aldehydsäure-Reduktions-Test

Für die Bestimmung der Mevalonsäure-Dehydrogenase-Aktivität in Rohextrakten, auf die sich der optische Test von Knappe (11) nicht anwenden lässt, verwendeten wir einen zusammengesetzten Test, in dem ($^+$)-Aldehydsäure durch den zu testenden Enzym-extrakt und ein TPNH-lieferndes System in Mevalonsäure überführt, diese nach Abstoppen der Reaktion und Ansäuern mit Äther extrahiert und mit der Mevalonatkinase bestimmt wird:





In einem Volumen von 2,0 ml werden

168 μM Triäthanolamin-HCl-Puffer (pH 7,45)	
2 μM K_2Mg -Äthylendiamintetraacetat	
1 mg Serumalbumin	
1 μM TPN	
10 μM K_2 -Glucose-6-phosphat	} Boehringer & Söhne, Mannheim
0,01 ml Zwischenferment (ZF)	
1 - 2 μM ($\pm$)-Aldehydsäure	
und 1 ml zellfreier Enzymextrakt	

60 Min. bei 37° C inkubiert; die Reaktion stoppt man durch Erhitzen auf 100° (3 Min.), säuert den ganzen Ansatz mit 300 mg Dowex 50 (H^+) an, perforiert 9 Stunden mit peroxyd-freiem Äther, gibt 0,1 ccm 4 n KOH zu und destilliert den Äther nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 ab. Der Rückstand wird in 1 ml H_2O aufgenommen und mit der Mevalonatkinase der Gehalt an (+)-Mevalonat bestimmt. Reaktionsstart mit 0,1 ml Testlösung, $V = 1,98$ ml, $d = 1$ cm, $T = 20^\circ$. Ein Blindversuch wird auf gleiche Weise unter Ersatz der Aldehydsäure-Lösung durch H_2O durchgeführt und der im Mevalonatkinase-Test gefundene ΔE -Wert vom Originalwert abgezogen.

2. Ausgangsmaterial

a) ($\pm$)- β -Hydroxy- β -methylglutaraldehydsäure

Die für unsere enzymatischen Versuche verwendete ($\pm$)-Aldehydsäure stellten wir nach der Methode von Eggerer und Lynen (21) ausgehend vom Acetessigaldehyddimethylacetal dar. Das

kristalline Ba-Salz der ($\pm$)- δ, δ -Dimethoxy- β -hydroxy- β - methyl-valeriansäure wurde vor Gebrauch in etwas H_2O (0,5 - 2,0 ccm) gelöst, mit einem Überschuss Dowex 50 (H^+ , 200 - 400 mesh) 20 Min. geschüttelt, der Austauscher abzentrifugiert, mit etwas H_2O gewaschen, Überstand und Waschwasser mit KOH neutralisiert und auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Diese Aldehydsäure-Lösung lässt sich ohne merkbaren Aktivitätsverlust 1 - 2 Wochen eingefroren bei -16° aufbewahren.

b) Herstellung der Hefe-Präparate

(1) Hefezellsuspensionen

200 g ungespreste Oberkottzauer Bäckerhefe werden 3-mal mit flüssiger Luft eingefroren und vorsichtig aufgetaut. Die auf diese Weise verflüssigte Hefe verrührt man bei 0° mit 300 ccm 1,15 proz. KCl-Lösung und zentrifugiert 10 Min. bei 5 000 g. Die überstehende trübe Lösung verwirft man und wäscht den Rückstand noch 3-mal mit je 300 ccm 1,15 proz. KCl-Lösung aus (unter Verwendung eines Plümpers). Die Überstände der Zentrifugationen werden verworfen und die resultierende plasmolysierte Hefe mit 1,15 proz. KCl auf 200 ccm verdünnt. Die so gewonnene Zellsuspension ist eingefroren bei -16° mehrere Monate haltbar. Einmal aufgetaute Präparate müssen sofort verwendet werden.

(2) Zellfreie Enzymlösungen

200 g ungespreste Oberkottzauer Bäckerhefe werden 3-mal mit flüssiger Luft eingefroren und vorsichtig aufgetaut. Die verflüssigte, lebhaft gärende Hefe wird nun 4-mal mit je 300 ccm 1,15 proz. KCl-Lösung im Kühlraum gewaschen und jeweils bei 0° und 5 000 - 6 000 g zentrifugiert. Die überstehenden Lösungen verwirft man. Die so gewaschene Hefe wird mit insgesamt 80 ccm 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7.0 auf 200 ccm verdünnt und in 50 ccm-Portionen eingefroren.

50 g (50 ccm) Hefeextrakt verteilt man nun auf 2 Schlossmann-Flaschen, gibt in jede Flasche 25 g Glasperlen (31/10) und 10 ccm 0.1 M K-Phosphatpuffer pH 7.0 und schüttelt 1 Min. hochtourig im Schlossmann-Zellhomogenisator (27) unter CO₂-Kühlung. Die aufgeschlossene Hefe wird abdekantiert, die Glasperlen mit je 10 ccm K-Phosphatpuffer gewaschen und Hefeextrakt + Waschwasser 20 Min. bei 20 000 g zentrifugiert; Rückstand verworfen. Überstehende Lösung: 52 ml (86,02 mg Protein/ml) ¹⁾.

Die 52 ml Überstand verdünnt man mit 0.1 M K-Phosphatpuffer auf 150 ccm und gibt unter Eiskühlung und magnetischem Rühren langsam 77,4 g trockenes Ammonsulfat (80 proz. Sättigung) hinzu. Der pH-Wert wird dabei durch Zutropfen 4 n KOH auf etwa 7 gehalten. Nach beendigter Ammonsulfat-Zugabe wird noch 30 Min. bei 0° gerührt, dann 20 Min. bei 20 000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Hefe-Rückstand mit 0.1 M K-PO₄-Puffer (pH 7.0) auf 31 ml verdünnt (46,1 mg Protein/ml) = A S I.

Die Mevalonsäure-Dehydrogenase-Aktivität dieses Extraktes wurde mit dem optischen Test von Knappe et al. (11) bestimmt.

Die Messküvette, d = 1 cm, enthält in einem Volumen von 1,8 ml : 160 μ M K-Phosphatpuffer pH 7.0, 10 μ M K₄-Äthylen-diamin-tetraacetat, 0,2 - 0,3 μ M TPNH, 3 μ M (⁺)-Aldehydsäure, 1 mg Serumalbumin und 1,38 mg (0,03 ml) A S I. Die Reaktion wird mit der Enzymlösung gestartet und bei λ = 366 m μ gegen eine Vergleichsküvette ohne Aldehydsäure verfolgt; T = 20° C. $\Delta E_{366 \text{ m}\mu} = 0.035/13 \text{ Min.} = 0.0027/\text{Min.}$

Das entspricht einem Umsatz von

$$\Delta C = \frac{0.0027 \cdot 1,80}{3.3} = 0.00147 \text{ } \mu\text{M TPNH/Min.}/1,38 \text{ mg}$$

$$\text{Spezif. Akt.} = \frac{\text{m } \mu \text{ Mol Substrat/Min.}}{1 \text{ mg Enzym}} = 1,065$$

1) Proteinbestimmungen wurden mit der Biuret-Methode (62) ausgeführt.

c) Untersuchung eines Escherichia coli-Präparates auf Mevalonsäuredehydrogenase-Aktivität

8,15 g Escherichia coli-B-Zellen ¹⁾ (feucht) suspendierten wir in 11,9 ml 0.2 M Trispuffer (pH 7.0), gaben 40 g Glasperlen (31/10) und 1 Tropfen Silicon-Antischaum hinzu und schüttelten 45 sec. im Schlossmann-Zellhomogenisator hochtourig unter CO₂-Kühlung. Anschliessend wurde mit 4 ml Trispuffer verdünnt und 20 Min. bei 20 000 g zentrifugiert. Den Überstand (12,5 ml; 26,3 mg Protein/ml) prüften wir mit dem Aldehydsäure-Reduktions-Test (siehe Abschnitt 1 d) auf Mevalonsäuredehydrogenase-Aktivität. Das Präparat zeigte keine Aktivität.

d) Reinigung der Mevalonatkinase aus Hefe (nach U. Henning, unveröffentlichte Versuche)

(1) Enzym-Test

Die Enzymaktivität wurde im zusammengesetzten optischen Test durch Kopplung der Mevalonatkinase-Reaktion mit der Pyruvatkinase- und Lactatdehydrogenase-Reaktion unter Sättigung des Enzyms mit Substrat bestimmt.

(2) Definition der Enzymeinheit

Als 1 Enzymeinheit (EE) definieren wir diejenige Enzymmenge, die im optischen Test in 1 Minute 1 mμ Mol (+)-Mevalonsäure phosphoryliert, d.h. entsprechend der Gleichung

$$\Delta c = \frac{E_{366 \text{ m}} \cdot V}{\text{DPNH}}$$

worin Δc : die Konzentrationsänderung des DPNH
 ΔE : die Extinktionsänderung der DPNH-bande
bei 366 mμ

¹⁾ Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Herrn Priv.Do. Dr. L. Jaenicke zur Verfügung gestellt.

V: das Volumen des Testansatzes (1,90 ml)

ϵ_{DPNH} : molarer Extinktionskoeffizient von DPNH
($3,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$)

bedeuten, eine Extinktionsabnahme $\Delta E_{366 \text{ m}\mu} = 0.00174/$
Min. bewirkt, was einem Umsatz von

$$\Delta C = \frac{0.00174 \cdot 1,90}{3,3} = 1 \text{ m}\mu \text{ Mol DPNH/Min.}$$

entspricht.

Als spezifische Aktivität bezeichnen wir:

spez. Akt. = m μ Mol Substrat/Min./1 mg Enzym

= Enzymeinheiten/mg Gesamtprotein

Tabelle VI: Anreicherung der Mevalonatkinase aus
Bäckerhefe

Reinigungsstufe	Gesamt- protein (mg)	Enzym- einheiten (EE)	spezif. Aktivität (EE/mg Protein)
Toluolautolysat	13 400		
Überstand der Säurefällung (pH 5,7)	12 300		
Ca ₃ (PO ₄)-Gel- Eluat	940		
1. Ammonsulfat- Fällung (AS I)	374	8 560	22,9
Hitzeschritt + Dialyse	202	6 580	32,6
Ammonsulfat- Fraktionierung (AS II)	55	5 186	94,3

(3) Anreicherungsangang

Autolyse mit Toluol

600 g ungespresste Oberkottzauer Bäckerhefe (einige Tage im Kühlraum bei 0° gehalten) werden fein zerkrümelt, im Thermostaten auf 37° gebracht, dann mit 36 ml dest. Toluol versetzt und 45 Min. bei 37° inkubiert. Darauf gibt man 30 ml Wasser zu und hält den Ansatz weitere 45 Min. unter häufigem Umrühren bei 37°. Die verflüssigte, lebhaft gärende Hefe wird auf Raumtemperatur gebracht, mit 500 ml dest. H₂O versetzt und der pH-Wert während 3 - 4 Stunden durch Zutropfen 5 n KOH unter Rühren zwischen 7,2 und 7,4 gehalten. Das Autolysat bleibt dann noch 12 - 16 Stunden bei Raumtemperatur stehen, worauf 20 Min. bei 5 000 g zentrifugiert wird (Rückstand verworfen).

Überstand: 750 ml (17,9 mg Protein/ml)

Die folgenden Operationen werden bei 0° ausgeführt.

Säurefällung und Adsorption an Ca₃(PO₄)₂-Gel

Den pH-Wert des Überstandes bringt man mit 2 M Essigsäure an der Glaselektrode unter magnetischem Rühren und Eiskühlung auf 5,7 und zentrifugiert das ausgefallene Protein in 15 Min. bei 20 000 g ab.

Zum Überstand (755 ml; 16,3 mg Protein/ml) gibt man Calciumphosphat-Gel im Verhältnis Gel-Trockengewicht: Protein = 0.5 unter mechanischem Rühren in 5 bis 10 Min. Nach 10 Min. weiteren Rührens wird das Gel bei 5 000 g abgeschleudert, der Überstand verworfen. Das Gel eluiert man unter Verwendung eines Plümpers zunächst mit 100 ml 0.1 M K-Phosphatpuffer (pH 6.0) und nach dem Zentrifugieren nochmals mit 80 ml frischem Puffer. Die klaren gelblichen Eluate werden vereinigt. V = 184 ml (5,1 mg Protein/ml).

1. Ammonsulfat-Fällung

Zum Geleluat gibt man langsam unter mechanischem Rühren 62,5 g reinstes, unter Zusatz von Äthylendiamintetra-acetat umkristallisiertes, im Vak. über KOH getrocknetes und fein zermahlendes Ammonsulfat (Sättigungsgrad: 0,57), lässt das Gemisch unter Rühren 15 Min. im Eisbad stehen und zentrifugiert den Niederschlag bei 20 000 g in 10 Min. ab. Der Überstand wird verworfen, das ausgefallene Protein in 33 ml 0.1 M K-Phosphatpuffer (pH 7.0) gelöst. V = 34 ml; 11 mg Protein/ml (A S I).

Hitzeschritt und Dialyse

Die Ammonsulfat-Fraktion erwärmt man in einem Wasserbad von 80° im Stahl-Zentrifugenbecher schnell auf 50 - 53° und hält sie dann 5 Min. im Thermostaten bei 55°. Nach raschem Abkühlen auf 0° in einem Eis-Kochsalzbad wird 10 Min. bei 20 000 g zentrifugiert und das denaturierte Protein verworfen. V = 36 ml, 5,61 mg Protein/ml.

Der Überstand wird gegen 2 l $\frac{M}{200}$ -K₂HPO₄ 8 Stunden bei 0° dialysiert, das K₂HPO₄ alle 2 Stunden erneuert. V = 40 ml.

Ammonsulfatfraktionierung

Zum Dialysat gibt man langsam unter Rühren 11,64 g Ammonsulfat (Sättigungsgrad: 0,5), rührt noch 10 Min., zentrifugiert dann 5 Min. bei 20 000 g und verwirft den Niederschlag. Der Überstand (V = 42,5 ml) wird mit 2,55 g Ammonsulfat versetzt (Sättigungsgrad: 0,6), 10 Min. im Eisbad gerührt und der Niederschlag in 10 Min. bei 20 000 g abgeschleudert. Das abzentrifugierte Protein löst man in 3,0 ml 0.1 M K-Phosphatpuffer (pH 7.0).

(V = 3,5 ml; 15,8 mg Protein/ml). (A S II).

(4) Stöchiometrie der Mevalonatkinase-Reaktion

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an (+)-Mevalonsäure zeigen Abb. 23 und 24.

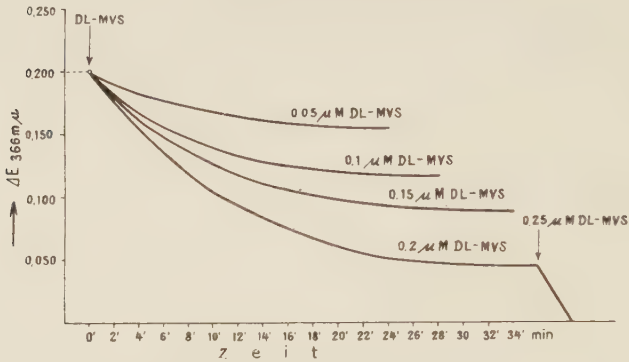


Abb. 23 Stöchiometrie der Mevalonatkinase - Reaktion

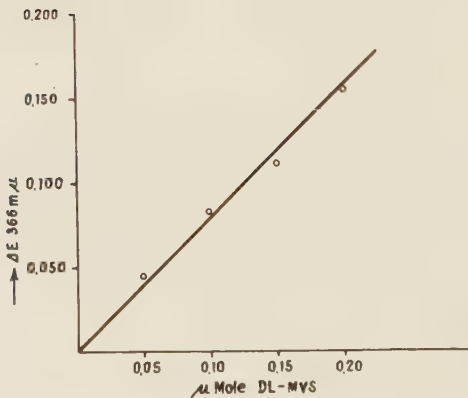


Abb. 24 Substrat abhängigkeit der Mevalonatkinase

3. Trennung von Mevalonsäure und Aldehydsäure an Dowex 1

- a) Ein Gemisch von 10 μM Mevalolacton und 10 μM Aldehydsäure in 1,3 ml H_2O gibt man auf eine Säule von Dowex 1, Cl^- (200 - 400 mesh; 1.0 · 7.5 cm) und eluiert zunächst mit dest. H_2O , anschliessend mit 0.01 M HCl im Kühlraum bei + 3°. Die Fraktionen werden mit der Hydroxamsäure-Methode auf Mevalonsäurelacton, mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin kolorimetrisch auf Aldehydsäure geprüft.

Tabelle (VII)

Elutionsmittel	Frakt. Nr.	ml Eluat	μM MVS-lacton	μM HMGas
H_2O	1	3,0	-	-
	2	3,0	6,0	0,15
	3	3,0	4,0	0,30
	4	3,0	-	0,16
	5	3,0	-	0,06
0.01 M HCl	6	10,0	-	7,30
	7	10,0	-	0,66
Σ : 10,0 μM				8,58 μM

- b) In einem Vol. von 20 ml inkubierten wir 20 μM ($\pm$)-Aldehydsäure, 46 μM KHCO_3 , 400 μM KF , 40 μM Na_2 -Glucose-6-phosphat, 1,2 μM TPN und 7,4 ml Hefezell-Suspension 30 Min. bei 37° C unter kräftigem Schütteln. Die Reaktion wurde mit 0,5 ml 30 proz. HClO_4 abgestoppt, das denaturierte Protein abzentrifugiert und 3-mal mit kleinen Portionen H_2O gewaschen. In dem mit dem Waschwasser vereinigten Überstand fanden wir kolorimetrisch 9,46 μM Aldehydsäure.

Die Lösung wurde nun 15 Min. mit Dowex 50 (H^+) geschüttelt, um die entstandene Mevalonsäure in die Lactonform zu überführen, filtriert, der pH-Wert der sauren Lösung auf 6 gebracht und auf eine Dowex 1-Säule (Cl^- ; 200 - 400 mesh; $1.0 \cdot 14.5$ cm) gegeben. Die vereinigten H_2O - und HCl -Eluate säuerten wir an und perforierten die beiden salzgesättigten Lösungen getrennt 7 Stunden mit peroxydfreiem Äther. Nach Trocknen und Abdampfen des Äthers wurden die Rückstände in H_2O aufgenommen, filtriert und auf Mevalonsäure (Hydroxamsäure-Test) und Aldehydsäure (Dinitrophenylhydrazin-Test) geprüft.

Tabelle (VIII)

Elutionsmittel	Frakt. Nr.	ml Eluat	μM MVS-lacton	μM HMGas
H_2O	1	33	3,6	0,21
0.02 n NH_4Cl in 0.01 M HCl	2	50	5,7	9,0
Σ :				9,3 μM
				9,21 μM

4. Trennung von Mevalonsäure und Aldehydsäure an saurem Celite

a) Elution mit reinem $CHCl_3$ ¹⁾

10 g Celite (mit Äther gewaschen und im Vak. getrocknet) wurden mit 4 ml 0.2 n H_2SO_4 vermischt, in $CHCl_3$ suspendiert und unter Druck in eine 18 mm-Säule geschlämmt. Auf die

¹⁾ Alle für die Celite-Chromatographie verwendeten Elutionsmittel wurden vor Gebrauch mit 0.2 n H_2SO_4 äquilibriert.

Celite-Säule wurde eine mit 2 g Celite vermischte Lösung (1 ml; pH < 2) von 40 μ M Mevalolacton und 34 μ M Aldehydsäure aufgetragen. Die Eluate engten wir am Vak. zur Trockene ein, versetzten den Rückstand mit kleinen Mengen H₂O und prüften mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin auf Aldehydsäure, mit Mevalonatkinase auf Mevalonsäure.

Tabelle (IX)

Frakt. Nr.	ml Eluat	μ M ($\frac{+}{-}$)-MVS	μ M HMGas
1	100	28,6	23,2
2	100	3,3	4,0
3	100	-	4,6

b) Elution mit Benzol-CHCl₃-Gemischen

5 g Celite wurden mit 2 ml 0.2 n H₂SO₄ vermischt, in Benzol suspendiert und unter Druck in eine 18 mm-Säule geschlämmt.

Auf die Celite-Säule trugen wir eine mit 1 g Celite vermischte wässrige Lösung (0,45 ml; pH < 2) von 20 μ M Mevalolacton und 10 μ M Aldehydsäure auf.

Aufarbeitung der eluierten Fraktionen wie unter (b).

Tabelle (X)

Frakt. Nr.	Elutionsmittel	ml Eluat	$\mu\text{M HMGas}$	$\mu\text{M } (\pm)\text{-MVS}$	
				unkorr.	korr.
1	Benzol	200	0,22	-	-
2	Be/ CHCl_3 (9:1)	100	0,65	14,5	13,0
3	Be/ CHCl_3 (9:1)	100	0,58	4,1	2,6
4	Be/ CHCl_3 (8:2)	100	0,70	2,6	1,1
5	Be/ CHCl_3 (8:2)	100	1,26	2,2	0,7
6	Be/ CHCl_3 (6:4)	100	1,00	1,7	0,2
7	Be/ CHCl_3 (6:4)	100	0,40	1,7	0,2
8	Be/ CHCl_3 (1:1)	100	0,42	-	-
9	Be/ CHCl_3 (1:1)	100	0,42	-	-
10	Be/ CHCl_3 (4:6)	100	0,91	-	-
11	Be/ CHCl_3 (4:6)	100	0,91	-	-
12	Be/ CHCl_3 (2:8)	100	0,60	-	-
13	Be/ CHCl_3 (2:8)	100	0,60	-	-
14/15	CHCl_3	200	0,65	-	-

Bilanz:

eingesetzt	eluiert mit Be/CHCl_3 (9:1)	eluiert mit den restl. Be/CHCl_3 - Gemisch
20 $\mu\text{M MVS}$	15,6 $\mu\text{M MVS}$	2,2 $\mu\text{M MVS}$
10 $\mu\text{M HMGas}$	1,2 $\mu\text{M HMGas}$	9 $\mu\text{M HMGas}$

Ergebnis:

Mevalonsäure wird scharf mit dem Lösungsmittelgemisch Benzol/ CHCl_3 (9:1) eluiert, während Aldehydsäure verwaschen, hauptsächlich in den CHCl_3 -reicheren Fraktionen erscheint.

Die durch den Mevalonatkinase-Test erhaltenen ($^{+}$)-Mevalonat-Werte müssen um einen Faktor von ca. 1,5 μ M pro 100 ml Eluat korrigiert werden, da auch mevalonsäure-freie Benzol/ CHCl_3 -Rückstände im Test eine geringfügige DPNH-Oxydation verursachen.

5. Trennung von Mevalonsäurelacton und Aldehydsäure durch Hochspannungselektrophorese

Ein Gemisch von ca. 50 μ M Mevalolacton und 50 μ M Aldehydsäure wurde in 0,7 ml H_2O auf einen mit Pyridin-Acetat-Puffer (pH 4.7) getränkten, abgepressten Bogen Schleicher & Schüll-Papier 2043 b (40 · 23 cm) aufgetragen und 2 Stunden im gleichen Puffer der Hochspannungselektrophorese bei 75 mA und 1 300 V unterworfen. Nach Trocknen des Papiers im Luftstrom und Wasserdampfbehandlung zur Vertreibung der Essigsäure besprühten wir einen Kontaktstreifen mit Dinitrophenylhydrazin-Reagens (0,1 g in 50 ml Methanol + 0,5 ml konz. HCl), einen zweiten Kontaktstreifen mit neutralisierter 2 M NH_2OH -Lösung und nach dem Trocknen mit FeCl_3 -Reagens nach Stadtman (50 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ pro 1 l 95 proz. alkohol. 0.1 n HCl). Die Dinitrophenylhydrazon- und die Hydroxamsäure-Regionen wurden herausgeschnitten, 8 Stunden mit H_2O eluiert, die Eluate kolorimetrisch auf Aldehydsäure bzw. Mevalolacton geprüft: Gefunden 36,4 μ M Aldehydsäure bzw. 41,5 μ M Mevalolacton, Laufstrecken: Front der Dinitrophenylhydrazon-Bande: 7,5 cm
Front der Hydroxamsäure-Bande: 0,5 cm.

Eine schwache Dinitrophenylhydrazon-Bande bei 9,3 cm kann der durch Dehydratisierung entstandenen β -Methylglutaconaldehydsäure zugeschrieben werden. Elution dieser Bande und kolorimetrische Aldehydbestimmung des Eluates ergab 4,8 μ M Aldehyd.

6. Enzymatische Synthese von Mevalonsäure.

Präparative Ansätze

a) Inkubation

In zwei Ansätzen inkubierten wir in einem Vol. von 60 ml jeweils 113 μM ($\pm$)-Aldehydsäure, 280 μM Na_2 -Glucose-6-phosphat, 7 μM TPN, 1 mM KF, ¹⁾ 1,49 mM NaHCO_3 -Puffer (pH 7.2) mit 50 ml Hefezellsuspension (50 g plasmolysierte, ausgewaschene Hefe in 1,15 proz. KCl) 30 Min. bei 37° unter häufigem Rühren.

In einem dritten Ansatz wurden in einem Vol. von 64 ml 119 μM ($\pm$)-Aldehydsäure, 320 μM Na_2 -Glucose-6-phosphat, 7 μM TPN, 2 mM KF, 2 mM NaHCO_3 -Puffer (pH 7.2) und 50 ml Hefezellsuspension 30 Min. bei 37° inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zusatz von jeweils 5 ml 30 proz. Metaphosphorsäure abgestoppt und die Denaturierung des Eiweisses durch 4 Min. Erhitzen auf 80° vervollständigt. Das bei 18 000 g abzentrifugierte Protein wurde 2-mal mit H_2O gewaschen. Die vereinigten Überstände und Waschwässer brachten wir durch Zutropfen konz. HCl auf pH < 2, sättigten die Lösungen mit Ammonsulfat und perforierten über Nacht mit peroxydfreiem Äther (1. Äther-Extraktion). Nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 und Abdestillieren des Äthers bestimmten wir den Mevalonsäure-Gehalt des in H_2O und etwas verd. KOH aufgenommenen Rückstandes mit der Mevalonatkinase.
Gefunden: 161 μM Mevalonat,
Ausbeute: 46,7 %.

b) Chromatographische Reinigung der Mevalonat-Extrakte

Dowex 50 (200 - 400 mesh) wurde durch sukzessives Waschen mit 7,5 proz. HCl, $\frac{\text{M}}{100}$ HCl und H_2O (bis Cl^- -frei) in die H^+ -Form überführt, Dowex 1 (100 - 200 mesh, X 10) zunächst mit 8 proz. NaOH in die OH^- -Form, dann mit 8 proz. HCl in die Cl^- -Form gebracht. Anschliessend aequilibrierten wir diesen Austauschere mit $\frac{\text{M}}{100}$ HCl.

1) siehe Seite 97

Zur Chromatographie gaben wir die schwach alkalischen Mevalonat-Extrakte (6,8 ml) auf die Dowex 50-Säule (1,0 · 8,5 cm), brachten diese über einer Dowex 1-Säule (1,0 · 17,0 cm) an und eluierten kontinuierlich mit H₂O durch beide Säulen, bis das Dowex 50-Eluat den pH-Wert des dest. H₂O zeigte. Der Anionenaustauscher wurde noch mit einigen ccm $\frac{M}{100}$ HCl gewaschen, das gesamte Eluat (90 ml) angesäuert, mit Ammonsulfat gesättigt und über Nacht mit peroxydfreiem Äther perforiert (2. Ätherextraktion).

Der Ätherextrakt wurde nach Abdampfen des Äthers in 3,4 ml H₂O aufgenommen, mit 10 n H₂SO₄ auf pH 1 - 2 angesäuert und mit 3 g Celite vermischt auf eine Celite-Säule aufgetragen.

Bereitung der Celite-Säule: 10 g Celite (der Fa. Johns Manville; mit Äther gewaschen und am Vak. getrocknet) vermischt man mit 4 ml 0.2 n H₂SO₄, suspendiert das schwefelsaure Celite in Benzol und schlämmt es unter Druck in eine 20 mm-Säule ein. Vor dem Auftragen der Substanz wird die Säule gründlich mit Benzol gewaschen. Durch Elution mit Benzol-CHCl₃ (9:1) wurde das Mevalolacton in 200 ml-Fractionen von der Säule gewaschen, diese am Vak. eingedampft und nach dem Aufnehmen in H₂O enzymatisch auf Mevalonsäure geprüft. In einem Blindversuch engten wir 200 ml Benzol-CHCl₃ (9:1) am Vak. ein, digerierten den Rückstand mit Wasser und fanden im Mevalonatinase-Test eine geringfügige Extinktionsabnahme ($\Delta E_{366} = 0.015$, $V = 1,90$ ml, $\Delta C = 0.00864 \mu M$ MVS/0.01 ml), die einem Blindwert von 3,1 μM /200 ml Eluat entspricht. Dieser Faktor wurde bei den in Tabelle (XI) angegebenen Mevalonsäure-Werten berücksichtigt.

Tabelle (XI): Reinigung der Mevalonatextrakte
an saurem Celite

Frakt. Nr.	ml Eluat	ml wässr. Testlösung	$\Delta E_{366 \text{ m}\mu}$	(+) - MVS	
				unkorr.	korr.
1	400	5,5	0.064	20,3	14,1
2	200	3,0	0.298	51,5	48,4
3	200	4,0	0.252	58,0	54,9
4	200	6,0	0.069	24,0	20,9
5	200	2,9	0.060	10,0	6,9
6	200	2,9	0.024	4,0	0,9
7	200	2,9	0.020	3,3	0,2
				170,6	140,3

Die erhaltenen Mevalonsäure-Lösungen wurden vereinigt, angesäuert, mit Ammonsulfat gesättigt und über Nacht mit peroxyd-freiem Äther perforiert (3. Ätherextraktion). Der Rückstand wurde nach Abziehen des Äthers in H_2O aufgenommen und filtriert.

c) Kristallisation der Mevalonsäure als Dibenzyläthylen-
diammonium-Salz

Wir titrierten nun die Mevalonolacton-Lösung (4,3 ml) mit 0,0149 M $Ba(OH)_2$ gegen Phenolphthalein bei ca. 40° in einem thermostatisierten Wasserbad und fanden einen Laugenverbrauch von 5,44 ml, woraus sich ein Mevalonsäure-Gehalt von 162 μM errechnet, da pro Mol Mevalonsäure $\frac{1}{2}$ Mol Ba^{++} zur Salz-bildung benötigt werden. Zu der Ba-Mevalonatlösung gaben wir die der verbrauchten Barytlauge äquivalente Menge Dibenzyl-äthylendiammoniumsulfat (27,4 mg [81 μM] in 1 ml H_2O), zentrifugierten das ausgefallene $BaSO_4$ ab, das 2-mal mit kleinen Portionen H_2O gewaschen wurde. Die klare wässrige

Lösung wurde nach Zusatz von 1 Tropfen Octanol am Vak. eingeeengt, der Rückstand in 5 ml Methanol aufgenommen und erneut am Vak. zur Trockene gebracht. Den kristallinen Rückstand überführten wir nach dem Trocknen im Vakuum-exsikkator mit Methanol in ein kleines Kölbchen, engten die methanolische Lösung etwas ein und brachten das Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat mit einem Überschuss Äther zur Kristallisation. Vervollständigung der Kristallisation durch Stehen bei 0°. Wir erhielten 30 mg N,N'-Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat, was einer Ausbeute von 112 μM Mevalonsäure = 32,5 % (bezogen auf die eingesetzte Menge ($^+$)-Aldehydsäure) entspricht.

Das 4-mal aus Methanol/Äther umkristallisierte Produkt zeigte einen Smp. von 122 - 124° (Kofler-Block). Synthetisch hergestelltes Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat, das bei 124 - 126° schmolz, gab beim Vermischen mit dem enzymatischen Mevalonsäuresalz keine Schmelzpunktdepression.

d) Enzymatische Phosphorylierung von enzymatisch und synthetisch hergestellter Mevalonsäure

(1) Herstellung der K-Mevalonat-Lösungen:

7,24 mg (13,5 μM) enzymatisch bereitetes Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat bzw. 7,02 mg (13,1 μM) ($^+$)-Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat löste man in 0,5 ml H_2O und schüttelte die Proben 30 Min. mit ca. 200 mg Dowex 50 (H^+ , 200 - 400 mesh). Nach Abfiltrieren und Waschen des Austauschers wurde das Filtrat mit 4 n KOH (2 Tropfen) schwach alkalisch gemacht und auf 3,1 bzw. 3,2 ml verdünnt.

Konz. der enzymat. Mevalonat-Lösung: 8,7 $\mu\text{M}/\text{ml}$

Konz. der ($^+$)-Mevalonat-Lösung: 8,2 $\mu\text{M}/\text{ml}$

(2) Herstellung der Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat-Lösungen:

0,707 mg enzymatisch bereitetes Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat ($1,32 \mu\text{M}$) wurden in 0,25 ml 0.2 M TRAM/HCl (pH 7.4) gelöst.

Konz.: $10,55 \mu\text{M/ml}$

1,555 mg ($^{+}$)-Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat ($2,91 \mu\text{M}$) wurden in 0,6 ml 0.2 M TRAM/HCl (pH 7.4) gelöst.

Konz.: $9,69 \mu\text{M/ml}$

Die Messküvette enthielt im Volumen von 1,89 ml: $340 \mu\text{M}$ TRAM/HCl (pH 7.4); $160 \mu\text{M}$ KCl; $40 \mu\text{M}$ MgSO_4 ; $1 \mu\text{M}$ K_3 -Phosphoenolpyruvat; $0.6 \mu\text{M}$ DPNH; $2 \mu\text{M}$ ATP; 1 mg Serumalbumin; 25 γ Lactatdehydrogenase; 10 γ Pyruvatkinase, 0,237 mg Mevalonatkinase (spezif. Akt. 94,3) und 0.01 ml der zu prüfenden Lösung.

Die gefundenen (+)-Mevalonsäure-Werte zeigen Tabelle I und Abb. 5, Abschnitt B.

e) Hydroxamsäure-Test

Herstellung der Mevalonsäurelacton-Lösungen:

- (1) 10,12 mg ($18,9 \mu\text{M}$) enzymatisch bereitetes Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat löste man in 0,8 ml H_2O , schüttelte die Lösung 20 Min. mit einem Überschuss Dowex 50 (H^+), zentrifugierte den Austauscher ab und wusch 2-mal mit je 0,3 ml H_2O nach.

Konz. der Mevalolactonlösung: $27 \mu\text{M/ml}$

- (2) In analoger Weise wurden 10,516 mg ($19,6 \mu\text{M}$) synthet. ($^{+}$)-Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat in Mevalonsäurelacton überführt.

Konz. der ($^{+}$)-Mevalolactonlösung: $26,1 \mu\text{M/ml}$

Das Ergebnis der Hydroxamsäurebestimmung mit den beiden Eichlösungen zeigen Tabelle II und Abb. 4, Abschnitt B.

f) UV-Absorptionsspektren (Abb. 6, Tabelle XII)

Die Spektren wurden in einer 1 cm-Quarzküvette gegen eine Vergleichsküvette mit 0.1 M K-Phosphat-Puffer (pH 7.0) bei Raumtemperatur im Zeiss-Spektrophometer gemessen.

Tabelle (XII)

Verbindung	c (Mol/l) in 0.1 M K-PO ₄ , pH 7	$\epsilon_{256 \text{ m}\mu}$	$\epsilon_{261 \text{ m}\mu}$
MVS-DBÄD-Salz (enzymat.)	0.001 M	445	408
($\pm$)-MVS-DBÄD-Salz	0.001 M	490	429

g) Hochspannungs-papiererelektrophorese ¹⁾

Auf einem Whatman 1-Papierstreifen (14 · 40 cm), der durch Besprühen mit Puffer imprägniert worden war, wurden ca. 1 μ M enzymat. Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat, 1 μ M synthet. ($\pm$)-Dibenzyläthylendiammonium-Mevalonat und 2 μ M ($\pm$)-Aldehydsäure aufgetragen und in Pyridin-Acetat-Puffer pH 6.2 der Hochspannungselektrophorese unterworfen (90 Min., 27 mA, 1 600 V).

Auswertung des Pherogramms: nach dem Trocknen des Papierstreifens im Luftstrom wurde dieser zur Vertreibung der

¹⁾ Pherograph-Original-Frankfurt,
Hormuth und Vetter, Heidelberg

Essigsäure 3-mal mit Wasserdampf gesättigt und mit dem Föhn getrocknet, anschliessend mit Methylrot in 0.05 m Boratpuffer, pH 8 (3 mg/l) besprüht.

Ergebnis: Die drei Säureflecken wandern einheitlich und gleich weit.

Laufstrecke = 17 cm.

h) Identifizierung des in der isolierten Mevalonsäure enthaltenen enzymatisch inaktiven sauren Bestandteils als (-)-Mevalonsäure

12,9 mg (24 μ M) enzymat. vorbereitetes Dibenzyläthylen-diammonium-Mevalonat wurden 20 Min. mit einem Überschuss Dowex 50 (H^+) geschüttelt, der Austauscher abfiltriert und mit etwas H_2O gewaschen.

Filtrat: 2,2 ml

Mevalonatkinase-Test:

$$\Delta E_{366\text{ m}} = 0.142 \text{ (Reaktionsstart mit 0,005 ml Testlösung, V = 1,88 ml)}$$

$$\Delta C = \frac{0.142 \cdot 1,88}{3.3} = 0.081 \mu\text{M (+)-MVS/0,005 ml bzw. 35,6 } \mu\text{M (+)-MVS/2,2 ml}$$

Die (+)-Mevalonsäure trennten wir nach der Methode von U. Henning et al. (13) durch Überführung in die ätherunlösliche 5-Phospho-Mevalonsäure von der ätherlöslichen (-)-Mevalonsäure ab:

250 μ M Tris-HCl-Puffer, pH 8.0

20 μ M $Mg(Ac)_2 \cdot 4 H_2O$

10 μ M K_2Mg -Äthylendiamintetraacetat

100 μ M ATP

3 mg Serumalbumin

35,6 μ M (+)-Mevalonsäure (in 2,2 ml H_2O)

7,9 mg Mevalonatkinase (spezif. Akt. 94,3)

wurden in einem Volumen von 4,0 ml $2\frac{1}{2}$ Stunden bei Raumtemperatur und anschliessend $1\frac{1}{2}$ Stunden bei 37° inkubiert. Das Gemisch erhitzte man dann 4 Min. auf 100° und säuerte nach dem Abkühlen mit Dowex 50 (H^{+}) an. Anschliessend perforierten wir den Ansatz 9 Stunden mit peroxydfreiem Äther, wobei die ätherlösliche (-)-Mevalonsäure in die Ätherphase geht, während die ätherunlösliche 5-Phospho-Mevalonsäure in der wässrigen Phase bleibt. Der Ätherextrakt wurde nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 eingeengt, der Rückstand in 1 ml H_2O aufgenommen und mit dem Hydroxamsäure-Test auf Mevalonsäure geprüft.

Hydroxamsäure-Test:

$$\Delta E_{546 \text{ m}\mu} = 0.162 \text{ (0,1 ml Testlösung)}$$

Das entspricht $6,7 \mu M$ (-)-Mevalonsäure/ml

Mevalonatkinase-Test:

Die Reaktion wurde wie üblich mit 0.01 ml der zu prüfenden schwachalkalischen Lösung gestartet. $V = 1,89 \text{ ml}$, $\Delta E_{366} = 0.007$ (entspricht der Grösse des Blindwertes, der auf Grund der Ätherperforation zu berücksichtigen ist).

Die im Hydroxamsäure-Test erfasste Substanz liess sich durch Hochspannungspapier-elektrophorese und Papierchromatographie als Mevalonsäure identifizieren:

- (1) $0,7 \mu M$ (-)-Mevalonat (0.1 ml) und $1 \mu M$ ($\pm$)-Mevalonat (0,01 ml) wurden auf einen mit Pyridin-Acetat-Puffer imprägnierten Whatman 1-Papierstreifen (12 . 40 cm) aufgetragen und in Pyridin-Acetat-Puffer pH 6.2 der Hochspannungselektrophorese unterworfen (60 Min., 30 mA, 1 500 V). Entwicklung des Pherogramms mit Methylrot/Boratpuffer (pH 8).

Laufstrecke der beiden einheitlichen Substanzen:
10 cm (Abb. 7)

- (2) In Anlehnung an die Methode von Stadtman und Barker (28) wurden 0,5 ml (-)-Mevalonsäure-Lösung (ca. 3,5 μM) sowie 0,5 ml ($\pm$)-Mevalonsäure (ca. 4 μM) mit je 1,5 ml 2 M NH_2OH , pH 7.2 (frisch bereitet durch Mischen gleicher Teile 4 M $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ und 4 M KOH) 45 Min. bei 37° inkubiert. Die beiden Hydroxamsäure-Lösungen dampfte man am Vak. zur Trockne ein, extrahierte das ausgefallene KCl 3-mal mit je 2 ml abs. Äthanol und zentrifugierte. Die überstehenden alkoholischen Lösungen wurden auf ein kleines Volumen eingeeengt und für die Papierchromatographie in wassergesättigtem n-Butanol verwendet:

Die beiden Hydroxamsäurelösungen trug man auf einen 12 cm breiten Whatman 1-Papierstreifen auf, liess ihn 6 Stunden in der Kammeratmosphäre hängen und chromatographierte dann absteigend mit H_2O -gesättigtem n-Butanol.

Laufzeit: $8 \frac{1}{2}$ Stunden

Entwicklung: Nach dem Trocknen des Papierstreifens besprühte man mit FeCl_3 -Reagens
(50 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 1 l 95 proz. alkoholischer 0,1 n HCl)

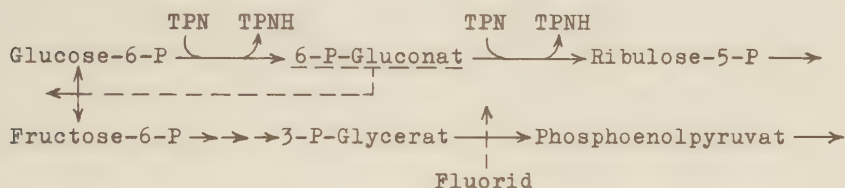
Ergebnis: R_f -Wert beider Hydroxamsäuren 0.138.

7. Kinetik der Aldehydsäure-Reduktion

- a) In einem orientierenden Versuch mit einer Hefezellsuspension, die mehrere Monate eingefroren bei -16° aufbewahrt worden war, inkubierten wir in einem Vol. von 10 ml 980 μM K-Phosphatpuffer pH 6.8, 50 μM Na_2 -Glucose-6-phosphat, 2 μM TPN, 500 μM KF, 25 μM ($\pm$)-Aldehydsäure, 0.01 ml Zwischenferment und 7,5 ml Hefezellsuspension.

Die zur Zeit t entnommenen 1 ml-Proben wurden mit 0,1 ml 30 proz. Metaphosphorsäure versetzt, das denaturierte Protein abzentrifugiert und 1-mal mit 0.5 ml H_2O gewaschen. Die Abnahme der Aldehydsäure-Konzentration verfolgten wir mit dem 2,4-Dinitrophenyldhydrazin-Test. Das Ergebnis zeigt Abb. 8 (Abschnitt B).

Der Zusatz von Fluorid verhindert einen anaeroben Abbau von Glucose-6-phosphat durch spezifische Blockierung der Enolase-Reaktion. Nach Potter (65) greift auch TPN indirekt zugunsten des oxydativen Abbaus ein, in dem das in der Zwischenfermentreaktion gebildete 6-Phosphogluconat die Phosphohexoisomerase kompetitiv hemmt:



- b) Für die weiteren Versuche verwendeten wir zellfreie Enzym-lösungen (ASI).

In einem Vol. von 20 ml inkubierten wir bei 37° $710 \mu M$ K-Phosphat-Puffer pH 7.0, $120 \mu M$ Na_2 -Glucose-6-phosphat, $6 \mu M$ TPN, 1 mM KF, $60 \mu M$ ($\pm$)-Aldehydsäure, 0.04 ml Zwischenferment ("Boehringer") und 10 ml ASI.

Zur Zeit t entnahmen wir dem Inkubationsansatz jeweils 1 ml, setzten 0.1 ml 30 proz. Metaphosphorsäure zu, zentrifugierten das denaturierte Protein ab und wuschen es 1-mal mit 1 ml H_2O . Die kolorimetrisch gefundenen Aldehydsäure-Werte lassen sich aus Tabelle (XIII) und Abb. 9 (Abschnitt B) entnehmen.

Die Auswertung der ΔE -Werte erfolgte mittels einer Eichkurve, die wir mit reiner 0.1 M ($\pm$)-Aldehydsäure, pH 7.0, erhielten. Ein $\Delta E_{546 m} = 0.170$ entspricht $0.1 \mu M$ ($\pm$)-Aldehydsäure.

Tabelle (XIII): Zeitabhängigkeit der enzymatischen
Aldehydsäure-Reduktion

Probe Nr.	t (Min.)	V (ml)	V (ml) Testlösung	$\Delta E_{546 \text{ m}\mu}$	$\mu\text{M } (^{\pm})\text{-Aldehyd-}$ säure pro 20 ml
1	0	2,05	0,1	0,247	59,6
2	10	2,00	0,1	0,231	54,4
3	20	"	"	0,194	45,6
4	30	"	"	0,173	40,7
5	50	"	"	0,138	32,5
6	60	"	"	0,122	28,7
7	80	"	"	0,102	24,0
8	100	"	"	0,088	20,7
9	120	"	"	0,072	17,0
10	150	"	"	0,062	14,6
11	180	"	"	0,054	12,7
12	210	"	"	0,043	10,2
13	240	"	"	0,038	8,94
14	270	"	"	0,034	8,0
15	330	"	"	0,027	6,35
16	360	"	"	0,023	5,4

c) Um eine nichtenzymatische Aldehydsäure-Reduktion auszu-
schliessen, inkubierten wir in einem Vol. von 20 ml bei
37°

710 μM K-Phosphat-Puffer pH 7.0, 120 μM
Na₂-Glucose-6-phosphat, 6 μM TPN, 1 mM KF,
60 μM ($^{\pm}$)-Aldehydsäure, 0.04 ml Zwischen-
ferment ("Boehringer") und 10 ml ASI a,

entnahmen zur Zeit t dem Reaktionsansatz jeweils 1 ml,
gaben 0.1 ml 30 proz. Metaphosphorsäure hinzu und ver-

dünnten mit H_2O auf 2,0 ml. Die Auswertung (Abb. 9, Tabelle XIV) erfolgte mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Test.

Bereitung von ASI a: 25 ml ASI wurden 4 Min. auf 100° erhitzt und nach raschem Abkühlen mit Eiswasser zentrifugiert. Der denaturierte Eiweissrückstand wurde verworfen, der Überstand als ASI a verwendet.

Tabelle (XIV): Aldehydsäure-Reduktion mit hitze-inaktiviertem Enzymextrakt

Probe Nr.	t (Min.)	V (ml)	V (ml) Testlösung	$\Delta E_{546m\mu}$	$\mu M (\pm)$ -Aldehydsäure pro 20 ml
1	0	2,0	0,1	0,273	60
2	10	"	"	0,273	60
3	20	"	"	0,280	61,8
4	40	"	"	0,298	65,7
5	60	"	"	0,305	67,2
6	90	"	"	0,311	68,6
7	120	"	"	0,336	74,1
8	150	"	"	0,341	75,2
9	180	"	"	0,352	77,6
10	210	"	"	0,335	74,0
11	240	"	"	0,347	76,5
12	300	"	"	0,333	73,4
13	330	"	"	0,322	71,0
14	360	"	"	0,321	70,8
15	450	"	"	0,317	70,0

- d) In einem 2. Blindversuch inkubierten wir 420 μM K-Phosphat-Puffer pH 7.0, 0,5 mM KF, 30 $\mu M (\pm)$ -Aldehydsäure und 5,0 ml ASI im Volumen von 10 ml bei $37^\circ C$ unter Fortlassung des reduzierenden Systems. Dem Reaktionsansatz wurden zur Zeit t

jeweils 1 ml entnommen, mit 0,1 ml 30 proz. Metaphosphorsäure versetzt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert, 1-mal mit 1 ml H_2O gewaschen und Überstand + Waschwasser mit $M-KHCO_3$ auf 2,0 ml aufgefüllt.

Wie Tabelle (XV) zeigt, fand auch in diesem Versuch keine Abnahme der Aldehydkonzentration statt.

Tabelle (XV): Aldehydsäure-Reduktion ohne reduzieren-
des System

Probe Nr.	t (Min.)	V (ml)	V (ml) Testlösung	$\Delta E_{546} \text{ m}\mu$	$\mu M (\frac{+}{-})$ -Aldehyd- säure pro 10 ml
1	0	2,0	0,1	0,247	29,1
2	5	"	"	0,248	29,2
3	10	"	"	0,246	29,0
4	15	"	"	0,257	30,2
5	20	"	"	0,257	30,2
6	30	"	"	0,259	30,5
7	40	"	"	0,253	29,8
8	60	"	"	0,260	30,6

II. Versuche zur Konfigurationsumkehr optisch aktiver Mevalonsäure

1. Mevalonsäurebenzhydrylamid

23,3 g (0,179 Mol) Mevalonsäurelacton ¹⁾ (Sdp. 0.01 mm 105 - 115°) wurden zusammen mit 35,2 g (0,192 Mol) Benzhydrylamin (Sdp. 11 mm 156 - 157°) 90 Min. in einem mit CaCl₂-Röhrchen verschlossenen Kolben bei 100° gehalten. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch in CHCl₃ aufgenommen, mit 2 n HCl, H₂O, n NaHCO₃ und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und am Vak. eingedampft. Den Rückstand löste man in Essigester und brachte das Amid durch Verdünnen mit Petroläther zur Kristallisation. Umkristallisiert wurde aus Essigester-Petroläther: Smp. 99 - 100° ²⁾.

Ausbeute: 45,8 g (81,5 % d.Th.), C₁₉H₃₃O₃N (313,4)

Das UV-Spektrum zeigt zwei Maxima (Abb. 25):

$$\epsilon_{259 \text{ m}\mu} = 607, \quad \epsilon_{253 \text{ m}\mu} = 530 \text{ (in Äthanol)}$$

IR (CHCl₃) : $\nu(\text{OH}+\text{NH})$ 2,92 μ ; $\nu(\text{C-H aliph.})$ 3,36 μ ;
 $\nu(\text{CO-NH, I})$ 6,0 μ ; $\nu(\text{CO-NH, II})$ 6,65 μ ;
 $\nu(\text{C-O, tert.OH})$ 8,87 μ (1130 cm⁻¹)
 $\nu(\text{C-O, prim.OH})$ 9,4 μ (1065 cm⁻¹) (Abb. 12)

Gemessene Konzentrationen:

$$\left. \begin{array}{l} 100 \text{ mg/ccm} \\ 50 \text{ mg/ccm} \end{array} \right\} 0,15 \text{ mm Schichtdicke}$$

$$15 \text{ mg/ccm}; \quad 1,00 \text{ mm Schichtdicke}$$

-
- ¹⁾ Das verwendete Mevalonsäurelacton wurde nach den Vorschriften von J.W. Cornforth et al. (30) und C.H. Hoffman et al. (8) aus Methylvinylketon hergestellt.
- ²⁾ Die Schmelzpunkte wurden mit dem Koflerblock bestimmt.

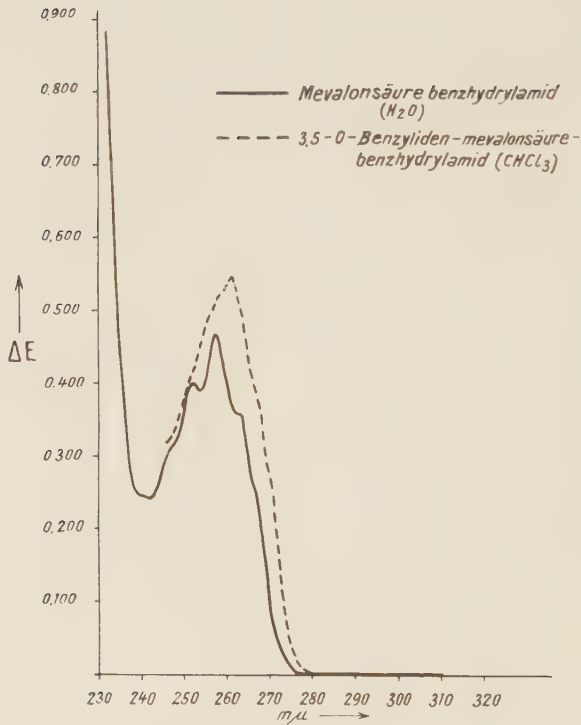


Abb. 25 UV - Absorptionsspektren

2. 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydrylamid [vgl. (63)]

1,75 g (5,6 m Mol) Mevalonsäurebenzhydrylamid wurden mit 70 ccm abs. Äther, 2 Tropfen konz. HCl und 2,4 g (28 m Mol) Dihydropyran (frisch dest. über NaOH) versetzt, $2\frac{1}{2}$ Stunden am Rückfluss erhitzt und dann 3 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Zugabe von etwas festem NaHCO_3 lässt man noch etwas stehen, filtriert, engt den Ätherextrakt auf ein kleines Volumen ein und gibt in der Siedehitze Petroläther hinzu. Beim Abkühlen auf 0° kristallisierte der Tetrahydropyranyläther aus. Umkristallisiert aus Äther - Petroläther. Smp. $82 - 83^\circ$. Ausbeute: 1,35 g (61 % d.Th.)



Ber. C 72,5 %, H 7,81 %, N 3,53 %

Gef. C 72,31 %, H 8,01 %, N 3,59 %

UV-Spektrum (Äthanol):

$$\epsilon_{259 \text{ m}\mu} = 642; \quad \epsilon_{253 \text{ m}\mu} = 0.582$$

IR (CHCl_3) : $\nu(\text{OH}+\text{NH})$ $2,92\mu$; $\nu(\text{CH aliph.})$ $3,42\mu$;
 $\nu(\text{CO-NH,I})$ $6,0\mu$; $\nu(\text{CO-NH,II})$ $6,7\mu$;
 $\nu(\text{C-O-CH-O-C})$ 8,9; 9,3 und $9,75\mu$ (Abb. 12)

Gemessene Konzentrationen:

20 mg/ccm; 1,0 mm Schichtdicke

7 mg/ccm; 1,0 mm Schichtdicke

3. 5-O-Triptyl-mevalonsäurebenzhydrylamid

Zu 626,8 mg (2 m Mol) Mevalonsäurebenzhydrylamid gab man eine Lösung von 612 mg (2,2 m Mol) Triphenylmethylchlorid in 15 ccm

wasserfreiem Pyridin und liess das Reaktionsgemisch 1 Woche bei Raumtemperatur stehen. Anschliessend wurde der Ansatz auf zerkleinertes Eis gegossen, das ausgefallene kristalline Produkt abgenutscht und über P_2O_5 im Vak. getrocknet.

Umkristallisiert aus Äthanol: Smp. 166 - 168°.

Ausbeute: 499 mg (ohne Mutterlauge), 45 % d.Th.

$C_{38}H_{37}NO_3$ (555).

Ber. C 82,1-%, H 6,58 %, N 2,52 %

Gef. C 81,86 %, H 6,40 %, N 2,68 %

UV-Spektrum (Äthanol):

$\epsilon_{259 \text{ m}\mu} = 1167$; $\epsilon_{253 \text{ m}\mu} = 1035$

IR ($CHCl_3$): $\nu(OH+NH)$ $2,93\mu$; $\nu(CH \text{ aliph.})$ $3,4\mu$

$\nu(CO-NH, I)$ $6,0\mu$; $\nu(CO-NH, II)$ $6,7\mu$

$\nu(C-O, \text{tert.OH})$ $8,83$; $\nu(C-O-C)$ $9,4\mu$

(Abb. 12)

Gemessene Konzentrationen:

30 mg/ccm; 1,0 mm Schichtdicke

10 mg/ccm; 1,0 mm Schichtdicke

4. 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamid

1,816 g (5,8 m Mol) Mevalonsäurebenzhydrylamid wurden in 5 ccm Dimethylformamid gelöst und mit 2,46 g (23,2 m Mol) Benzaldehyd (frisch dest.) und 5 Tropfen konz. H_2SO_4 versetzt. Man liess das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur stehen, sammelte das auskristallisierte Produkt auf einer Glasfilternutsche und digerierte es mit kaltem H_2O und Petroläther. Nach dem Trocknen über P_2O_5 im Vak. wurde aus Essigester umkristallisiert. Smp.: 182 - 183°.

Ausbeute: 2,2 g (95 % d.Th.) $C_{26}H_{27}NO_3$ (401).

Ber. C 77,8 %, H 6,73 %, N 3,49 %

Gef. C 77,76 %, H 6,55 %, N 3,87 %

UV-Spektrum (CHCl_3): $\epsilon_{261 \text{ m}\mu} = 545$ (Abb. 25)

IR (CHCl_3): $\nu(\text{N-H})$ $2,97 \mu$; $\nu(\text{CH aliph.})$ $3,35 \mu$;

$\nu(\text{CO-NH, I})$ $6,0 \mu$; $\nu(\text{CO-NH, II})$ $6,65 \mu$;

$\nu(\text{C-O-CH-O-C})$ 1198, 1145, 1110, 1092, 1044 cm^{-1}

Die angeführten Acetalbanden erscheinen schöner im KBr-Spektrum (Abb. 13) und sind diesem Spektrum entnommen.

5. β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamid

a) β -Hydroxy- β -methylvaleriansäuremethylester

Ein Gemisch von 69,2 g (0,96 Mol) Methyläthylketon und 153 g (1,0 Mol) Bromessigsäuremethylester in 250 ccm absol. Äther wurde innerhalb 1 Stunde zu einer mechanisch gerührten Suspension von 120 g (1,84 Mol) frisch aktiviertem und im Vak. getrockneten Zink (geraspelt) in 200 ccm absol. Äther getropft. Die Reaktion kam unter schwachem Erwärmen und Zusatz einiger Jodkristalle in Gang. Nach Abklingen des Ätherrückflusses erhitzte man noch $2\frac{1}{2}$ Stunden unter Rühren am Rückfluss, goss dann das Reaktionsgemisch auf zerkleinertes Eis und brachte das ausgefallene $\text{Zn}(\text{OH})_2$ durch vorsichtiges Ansäuern mit konz. HCl (bis pH 3 erreicht) wieder in Lösung. Die Ätherphase wurde abgetrennt, 3-mal mit n- NaHCO_3 , 2-mal mit gesätt. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt.

Die wässrige Phase säuerte man zusammen mit dem Waschwasser an und extrahierte 3-mal mit CHCl_3 . Nach dem Waschen mit n- NaHCO_3 und gesätt. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wurde gleichfalls mit Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt.

Den Rückstand unterwarf man einer Vakuum-Destillation:

Sdp. 12 mm 67 - 70°, Ausbeute: 123 g (87,5 % d.Th.)

b) β -Hydroxy- β -methylvaleriansäure

123 g β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäuremethylester (0.84 Mol) löste man in 150 ccm Methanol und 50 ccm H₂O. Dann liess man unter ständigem Rühren und Erwärmen auf ca. 60° aus einer Messbürette langsam 5,59 n NaOH zutropfen, wobei der pH-Wert beim Umschlagspunkt von Phenolphthalein gehalten wurde.

Laugenverbrauch: 152 ccm (0.85 Mol). Die alkalische Lösung blieb über Nacht bei Raumtemperatur stehen, wurde anschl. am Vak. konzentriert und unter Eiskühlung und Schütteln mit 69 ccm (0.85 Mol) konz., 12,3 n HCl versetzt. Die salzgesättigte Lösung perforierte man über Nacht mit peroxyd-freiem Äther, trocknete den Ätherextrakt mit Na₂SO₄ und engte ein. Der Rückstand wurde zunächst 2 Stunden am Vak. (15 mm) gehalten, wobei ein kleiner Vorlauf (23 - 25°) überging. Die zurückbleibende freie β -Hydroxy- β -methylvaleriansäure wurde am Hochvak. destilliert: Sdp. 0.01 mm 85 - 86°

Titration mit $\frac{n}{10}$ NaOH : Einwaage: 64 mg,
Laugenverbrauch: 4,80 ml

Mol.-Gew. 132, Äquiv.-Gew.: Ber. 66,0; Gef. 66,6.

Der pK'_a -Wert der Säure ergibt sich aus der mit dem "Radiometer Kopenhagen" aufgenommenen Titrationskurve (Abb. 26) beim Äquivalenzpunkt ([RCOOH] = [RCOO⁻]) nach der Henderson-Hasselbach-Gleichung zu 5,95 (Mittelwert von zwei Titrationen; es wurden 0.4 ml M/10 RCOOH sowie 0.2 ml M/10 RCOOH mit N/10 NaOH titriert).

IR (CHCl₃): ν (OH) 2,87 μ (3484 cm⁻¹)

ν (CH aliph.) 3,48 μ ; ν (C=O; Carboxyl) 5,87 μ
(1704 cm⁻¹) (Abb. 20)

Gemessene Konzentrationen:

6 mg/ccm	}	3 mm Schichtdicke
1 mg/ccm		
50 mg/ccm;		0,15 mm Schichtdicke

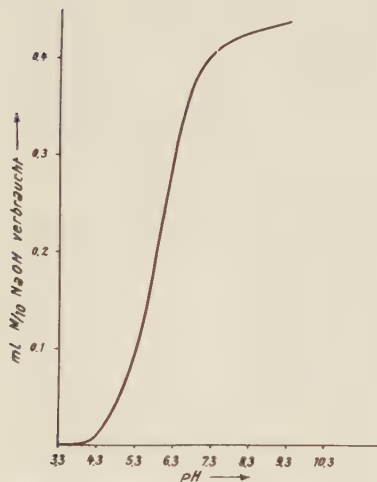


Abb. 26 Titrationskurve von β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäure.

c) β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäurebenzhydrylamid

7,116 g (0.054 Mol) β -Hydroxy- β -methylvaleriansäure, 10 g (0.0546 Mol) Benzhydrylamin und 11,1 g (0.054 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid gab man in insgesamt 75 ccm dest. Methylenchlorid gelöst unter Eiskühlung und magnetischem Rühren in einem Erlenmeyer-Kolben zusammen, wobei sich das Reaktionsgemisch stark erwärmte und fast unmittelbar Dicyclohexylharnstoff ausfiel. Der Ansatz wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Eiswasser

gekühlt und der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert (11,53 g). Um keinen Dicyclohexylharnstoff ins Filtrat zu bringen, wurde der Niederschlag nicht mit Methylenchlorid gewaschen!

Nach 3-maligem Waschen der Methylenchlorid-Lösung mit n HCl (100 ccm insgesamt) sowie gesätt. NH_4Cl -Lösung und Trocknen über Na_2SO_4 , wurde das Methylenchlorid abgezogen und der kristalline Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 10,35 g (65 % d.Th.). Nach 4-maligem Umkristallisieren aus Äthanol: Smp. 137 - 138°

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ (297) Ber. C 76,8 %, H 7,75 %, N 4,72 %
Gef. C 76,54 %, H 7,67 %, N 4,93 %

UV-Spektrum (CHCl_3): $\epsilon_{260 \text{ m}\mu} = 480$; $\epsilon_{254 \text{ m}\mu} = 400$

Es ist identisch mit dem UV-Spektrum des Mevalonsäurebenzhydrylamids (Abb. 25).

IR (CHCl_3): $\nu(\text{OH}+\text{NH})$ 2,92 μ ; $\nu(\text{CH aliph.})$ 3,36 μ ;
 $\nu(\text{CO-NH, I})$ 6,0 μ ; $\nu(\text{CO-NH, II})$ 6,65 μ ;
 $\nu(\text{C-O, tert. OH})$ 8,75 μ (1143 cm^{-1}) (Abb. 12)

6. Kinetik der alkalischen Verseifung von Mevalonsäurebenzhydrylamid

31,3 mg (100 μMol) Mevalonsäurebenzhydrylamid wurden in einem mit Rückflusskühler versehenen Zweihals-Kölbchen mit 10 ccm 0,49 n- $\text{Ba}(\text{OH})_2$ versetzt und das Kölbchen in ein auf 120° vorgeheiztes Ölbad gebracht. Da sich das Benzhydrylamid erst in der heissen Barytlauge löst, Beginn der Messung beim Siedeanfang.

Nach 0, 15, 30, 45, 60 und 90 Min. wurden dem Reaktionsgefäß jeweils 1 ccm Lösung entnommen, 15 Min. mit einer kleinen Portion Dowex-50 (H^+) geschüttelt, zentrifugiert und der klare Überstand abpipettiert. Der abzentrifugierte Austauscher wurde mit jeweils 0,5 ccm H_2O gewaschen und das Waschwasser nach

der Zentrifugation zum Überstand gegeben. Jede der 6 Proben machte man mit 1 Tropfen 4 n KOH alkalisch und verdünnte mit H₂O auf 1,5 ccm. Mittels der enzymatischen Mevalonsäure-Bestimmungsmethode (U. Henning, 1959) wurden die Proben auf Mevalonsäure geprüft (Abb. 10).

Die Messküvette (d = 1 cm) enthielt im Vol. von 1,905 ml 340 μ M TRAM/HCl pH 7.5, 160 μ M KCl, 40 μ M MgSO₄ · 7 H₂O, 1 mg Serumalbumin, 1 μ M K₃-Phosphoenolpyruvat, 0.625 μ M DPNH, 2 μ M ATP, 25 γ Lactatdehydrogenase, 10 γ Pyruvatkinase, 0.02 ml Testlösung und 0.02 ml Mevalonatkinase. Verfolgt wurde die Extinktionsabnahme bei 366 m μ im Photometer "Eppendorf" (T = 20°) gegen eine Vergleichsküvette, die alle Zugaben mit Ausnahme der Testlösung enthielt.

Tabelle (XVI): Zeitabhängigkeit der alkalischen Hydrolyse von Mevalonsäurebenzhydrylamid mit Barytlauge

Probe Nr.	t (Min.)	$\Delta E_{366 \text{ m}\mu}$ pro 0.02 ml	μ M (+)-Mevalonat pro 10 ml
1	0	0.026	22,5
2	15	0.067	58,0
3	30	0.110	95,2
4	45	0.118	102,0
5	60	0.115	99,6
6	90	0.112	97,0

Verseifung von Mevalonsäurebenzhydrylamid mit 0,25 n NaOH:

31,3 mg (100 μ Mol) Mevalonsäurebenzhydrylamid wurden mit 10 ccm 0,25 n NaOH 1 Stunde im Ölbad auf 120° erhitzt. Nach 15, 30, 45 und 60 Min. jeweils 1 ccm entnommen, Beginn der Messung beim Siedeanfang. Die einzelnen Proben behandelte man wie im vorhergehenden Versuch und bestimmte den Mevalonsäure-Gehalt mit der Mevalonatkinase.

Tabelle (XVII): Zeitabhängigkeit der alkalischen
Hydrolyse von Mevalonsäure-
benzhydrylamid mit NaOH

Probe Nr.	t (Min.)	μM ($\pm$)-Mevalonat pro 10 ml
1	15	74,0
2	30	88,0
3	45	97,5
4	60	100,0

7. Saure und alkalische Hydrolyse von 5-O-Tetrahydropyranyl-
mevalonsäurebenzhydrylamid

a) Saure Hydrolyse

28,8 mg (72,6 μM) Tetrahydropyranyläther wurden in 2 ml einer Lösung von 50 mg (263 μM) p-Toluolsulfonsäure in 15 ml Äthanol gelöst und 1 Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach Entfernen des Äthanols am Vak., löste man den Rückstand in etwas Wasser und liess die auf 90° erwärmte Lösung langsam abkühlen. Das ausgefallene kristalline Produkt wurde aus Essigester-Petroläther umkristallisiert und zeigte keine Schmelzpunktsdepression beim Vermischen mit authentischem Mevalonsäurebenzhydrylamid.

Papierchromatographische Identifizierung:

Auf einen Whatman 1-Papierstreifen trugen wir ca. 4 μM Mevalonsäurebenzhydrylamid, 4 μM 5-O-Tetrahydropyranylmevalonsäurebenzhydrylamid und ca. 4 μM Reaktionsprodukt der sauren Hydrolyse in etwas Aceton auf, liessen das Papier über Nacht in der Kammeratmosphäre hängen und chromatographierten dann 10 Stunden absteigend mit

wassergesättigtem n-Butanol. Nach dem Trocknen des Papiers wurden die Flecken durch ihre UV-Löschung lokalisiert.

Mevalonsäurebenzhydrylamid und Hydrolyseprodukt

$R_f = 0.83$

5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydrylamid

$R_f = 0.92$.

b) Alkalische Hydrolyse-Versuche

- (1) 79,4 mg (200 μ M) Tetrahydropyranyläther wurden in 7,5 ml Methanol gelöst und mit 2,5 ml n NaOH 5 Stunden unter Rückfluss gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde nach dem Konzentrieren am Vak. 3-mal mit peroxydfreiem Äther extrahiert, der Ätherextrakt getrocknet und eingeengt. Als Rückstand blieben 79,2 mg Ausgangsprodukt (Smp. $77 - 81^\circ$), das durch sein UV-Spektrum (Äthanol) als unverändertes 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydrylamid identifiziert wurde.

Die ausgeätherte wässrige Phase wurde papier-elektrophoretisch im Pherographen nach Wieland-Pfleiderer auf freie Säure geprüft: Pyridin-Acetat-Puffer pH 6.2, Whatman 1-Papier (10 · 40 cm; vor Gebrauch mit Puffer imprägniert), Laufzeit: 1 Stunde, 25 mA, 1 600 V, Entwicklung: nach Trocknen und Wasserdampfbehandlung des Papiers Besprühen mit Methylrot in 0.05 M Boratpuffer, pH 8 (3 mg/l). Es war keine Säure nachweisbar.

- (2) In zwei Parallelversuchen wurden 62,7 mg (200 μ M) Mevalonsäurebenzhydrylamid sowie 79,4 mg (200 μ M) Tetrahydropyranyläther in 3,2 ml frisch destill.

Methylcellosolve gelöst und mit 0,8 ccm 5 n KOH (Endkonz. 1 n) 19 Stunden auf 120° erhitzt. Anschliessend wurde neutralisiert, mit Wasser verdünnt und am Vak. zur Trockene eingeengt.

Im Falle des Mevalonsäurebenzhydrylamids nahm man den Rückstand in H₂O auf, säuerte an und perforierte über Nacht mit peroxydfreiem Äther. Im Ätherextrakt wurden nach dem Trocknen und Eindampfen und Lösen des Rückstandes in 3,1 ml H₂O (schwach alkalisch gemacht) mit dem Mevalonatkinase-Test 152 μ M ($\frac{1}{2}$)-Mevalonsäure nachgewiesen, was einer Ausbeute von 76 % entspricht.

Der Rückstand des Tetrahydropyranyläther-Ansatzes wurde ebenfalls in Wasser aufgenommen, 4-mal mit Äther extrahiert. Aus dem mit NaHCO₃ gewaschenen Ätherextrakt erhielt man ein bei 140 - 145° schmelzendes Produkt, dessen UV- und IR-Spektrum für die Anwesenheit der Benzhydrylamidgruppierung spricht und das seinem IR-Spektrum (KBr) nach mit Ausgangsprodukt verunreinigtes Mevalonsäurebenzhydrylamid darstellt: $\nu(\text{OH}+\text{NH})$ 3,08 μ ; $\nu(\text{CH arom.})$ 3,29 μ ; $\nu(\text{CO-NH, I})$ 6,08 μ ; $\nu(\text{CO-NH, II})$ 6,48 μ ; $\nu(\text{C-O; tert. OH})$ 8,95 μ ; $\nu(\text{C-O-C-O-C})$ 9,73 μ (sehr schwach); $\gamma(\text{monosubst. Phenyl})$ 14,4 μ .

Die wässrige Phase (16 ccm) blieb 2 $\frac{1}{2}$ Tage bei Raumtemperatur mit 4 ml 2 n H₂SO₄ stehen, um eventuell entstandene 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäure zu hydrolysieren, wurde dann 8 Stunden mit peroxydfreiem Äther perforiert und der Ätherextrakt nach dem Trocknen, Eindampfen und Aufnehmen des Rückstandes in 3,8 ccm schwach alkalischem H₂O mit dem Mevalonatkinase-Test auf Mevalonsäure geprüft: Keine Mevalonsäure nachweisbar! Auch der Bikarbonatauszug enthielt nach der üblichen Aufarbeitung (Ansäuern, Ausäthern der NH₄Cl-gesättigten Lösung) keine enzymatisch nachweisbare Mevalonsäure.

(3) 119,1 mg (300 μM) Tetrahydropyranyläther wurden in einem mit Anschützaufsatz, Vibromischer und Rückflusskühler versehenen 100 ccm-Kolben in 50 ccm gesättigter 0.49 n $\text{Ba}(\text{OH})_2$ suspendiert und 4 Stunden unter Vibration und Stickstoff-Durchleitung auf ca. 110° erhitzt. Nach dem Abkühlen extrahierte man 3-mal mit Äther. Aus dem gewaschenen und getrockneten Ätherextrakt gewannen wir 87 mg Ausgangsprodukt (Smp. $77 - 82^\circ$) zurück.

In einem analogen Versuch mit 25 ccm 0.25 n NaOH statt Barytlauge erhielten wir gleichfalls beim Ausäthern der wässrigen Lösung den grössten Teil des Ausgangsproduktes zurück. Die wässrige Phase wurde mit 4 g Dowex-50 (H^+) 45 Min. geschüttelt, filtriert und am Vak. auf 11 ccm eingeengt (pH 5 - 6). Hochspannungspapieroelektrophorese in Pyridin-Acetat-Puffer pH 6.2 (Whatman 1-Papier, $40 \cdot 10$ cm, Laufzeit 1 Stunde, 25 mA, 1 700 V, Entwicklung: Methylrot/Boratpuffer) zeigte einen im Verhältnis zur aufgetragenen Lösung verschwindend kleinen Säurefleck mit Laufstrecke 10 cm (Mevalonsäure: 13 cm). Zu der wässrigen Lösung (ca. 9 ml) gaben wir 0.64 ml 10 n H_2SO_4 , füllten mit Wasser auf 16 ml auf (H_2SO_4 -Endkonz.: 0,4 n) und liessen das Reaktionsgemisch $2 \frac{1}{2}$ Tage bei Raumtemperatur stehen. Anschliessend wurde die Lösung mit KOH schwach alkalisch gemacht und mit der Mevalonatkinase auf Mevalonsäure geprüft. Gefunden: 16,2 μM ($\pm$)-Mevalonat.

8. Saure und alkalische Hydrolyse von 5-O-Trityl-mevalonsäurebenzhydrylamid

a) Saure Hydrolyse

55,5 mg (100 μM) Trityläther wurden mit 3 ml 80 proz. Essigsäure 10 Min. unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit Wasser und filtrierte das ausgefallene Triphenylcarbinol (Smp. $155 - 160^\circ$) ab. Das Filtrat wurde am Vak. zur Trockene gebracht, der Rückstand 1-mal

mit Methanol am Vak. eingeengt, mit 10 ccm 0,25 n NaOH versetzt und 1 Stunde am Rückfluss auf 120° erhitzt. Nach dem Abkühlen säuerten wir an, sättigten die Lösung mit Ammonsulfat und perforierten über Nacht mit peroxydfreiem Äther. Der Ätherextrakt wurde nach dem Eindampfen und Aufnehmen in H_2O (mit KOH schwach alkalisch gemacht) enzymatisch auf Mevalonsäure untersucht: Gefunden $71,2 \mu M$ ($^{+}$)-Mevalonat; Ausbeute: 70 % d.Th.

b) Alkalische Hydrolyse

55 mg ($100 \mu M$) Trityläther kochte man in 35 ccm 0,86 n methanolisch-wässriger KOH (Methanol/ H_2O = 6:1) 8 Stunden unter Rückfluss. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung am Vak. konzentriert, das ausgefallene kristalline Produkt abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach der Umkristallisation aus Äthanol zeigte es einen Smp. von $167 - 170^{\circ}$ (keine Schmelzpunktsdepression beim Mischen mit authentischem Trityläther). Dass es sich um nichtumgesetztes Ausgangsprodukt handelt, wurde ausserdem durch Aufnahme des UV-Spektrums sichergestellt.

9. Saure und alkalische Hydrolyse von 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamid

a) Saure Hydrolyse

401 mg (1 mmol) 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamid wurden mit 30 ml Äthanol, 10 ml Eisessig und 10 ml n H_2SO_4 versetzt und 3 Stunden unter Rückfluss auf $100 - 110^{\circ}$ erhitzt. Bei Siedetemperatur geht das Benzal-Derivat vollständig in Lösung. Anschliessend wurde zum Entfernen des Äthanol am Vak. konzentriert, die verdünnte wässrige Lösung mit NaCl gesättigt, angesäuert und mit peroxydfreiem Äther perforiert. Nach Trocknen und Einengen des Ätherextraktes brachten wir den Rückstand zum Entfernen restlicher Essigsäure 5-mal am Vak. mit einigen ml Aceton

zur Trockene, nahmen ihn dann in Wasser auf, filtrierten, stellten den pH-Wert mit KOH auf 7 ein und verdünnten mit H_2O auf 10 ml.

Mevalonatkinase-Test:

$V = 1,895 \text{ ml}$, $T = 20^\circ$, $d = 1 \text{ cm}$, $\lambda = 366 \text{ m}\mu$

Gef.: $\Delta E_{366} = 0.322$ (Start mit 0.005 ml Testlösung)

Daraus errechnet sich ein ($\pm$)-Mevalonsäure-Gehalt von 740 μM (78 % d.Th.).

b) Alkalische Hydrolyse

802 mg (2 mmol) 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydryl-amid erhitze man in einem Gemisch von 60 ml n methanolischer KOH und 30 ml Methylcellosolve 29 Stunden unter Rückfluss. Anschliessend wurde das Lösungsmittel am Vak. entfernt, Wasser zugesetzt und 3-mal mit Essigester- $CHCl_3$ (10:1) extrahiert. Die wässrige Phase konzentrierten wir am Vak., sättigten sie mit NH_4Cl und extrahierten 5-mal mit Äther. Nach dem Trocknen und Einengen wurde der Rückstand papierelektrophoretisch auf Säure untersucht:

Puffersystem: Pyridin-Acetat, pH 6.2,

Papier: Whatman 1 (22 · 40 cm). Laufzeit: 1 Stunde (50 mA, 1 500 V). Entwicklung: Methylrot/Boratpuffer.

Als Vergleichssubstanzen dienten Mevalonsäure und β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäure, die beide die gleiche Laufstrecke von 11 cm zeigten. Im Hydrolyseprodukt war keine Säure nachweisbar.

In einem zweiten Versuch wurden 201 mg Amid (500 μM) in einem Gemisch von 30 ccm 1 n methanolischer KOH und 3 ml Morpholin 7 Stunden am Rückfluss erhitzt. Beim Abkühlen kristallisierte unverändertes Ausgangsprodukt aus der Lösung, das abgenutscht und mit Petroläther gewaschen wurde: 145 mg (72 %), Smp. 180 - 183°.

10. Alkalische Hydrolyse von β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid

In zwei parallel laufenden Versuchen wurden 62,7 mg Mevalonsäurebenzhydrylamid (200 μ M) und 59,4 mg β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid (200 μ M) in jeweils 10 ccm n KOH (Methanol/ H_2O = 1:1) 3 Stunden unter Rückfluss gekocht (100° Ölbadtemp.). Darauf verdünnte man beide Reaktionsgemische mit Wasser. Aus dem β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid-Ansatz kristallisierte sofort nicht umgesetztes Amid aus, das nach einigen Stunden bei 0° abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und über P_2O_5 im Vak. getrocknet wurde: 56,5 mg (95 %). Nach der Umkristallisation aus Äthanol- H_2O zeigte es einen Smp. von 128 - 131° (keine Mischschmelzpunktsdepression mit Ausgangsprodukt). Sein UV-Spektrum (in $CHCl_3$) erwies sich als völlig identisch mit dem des Ausgangsmaterials (gleiche molare Extinktionen).

Der Mevalonsäurebenzhydrylamid-Ansatz wurde am Vak. zum Entfernen des Methanols konzentriert, dann 45 Min. mit 4 g Dowex 50- (H^+) magnetisch gerührt. Der Austauscher wurde abfiltriert und mehrmals mit kleinen Portionen H_2O gewaschen. Das alkalische Filtrat prüften wir mit dem Mevalonatkinase-Test auf Mevalonsäure. $V = 1,90$ ml, $T = 20^\circ$, $d = 1$ cm, Gef.: $\Delta E_{366\text{ m}\mu} = 0.165$ (Reaktion mit 0,02 ml Testlösung gestartet).

Nach 16 Min. war die enzymatische Phosphorylierung beendet. Aus dem ΔE -Wert errechnet sich ein ($\pm$)-Mevalonsäure-Gehalt von 190 μ M (95 % d.Th.)

Um völlig sicher zu gehen, säuerten wir die wässrige Lösung mit konz. HCl an, sättigten sie mit Ammonsulfat und perforierten über Nacht mit peroxydfreiem Äther. Nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 dampften wir den Ätherextrakt ein, nahmen den Rückstand in 5 ml H_2O auf und neutralisierten ihn mit 2 n KOH.

Der Mevalonatkinase-Test ergab $162 \mu\text{M}$ ($\pm$)-Mevalonsäure ($V = 1,91 \text{ ml}$, $\Delta E_{366 \text{ m}\mu} = 0.273$; Testlösung $5,1 \text{ ml}$, Start der Reaktion mit $0,01 \text{ ml}$).

In einem weiteren Versuch erhitzen wir 534 mg ($1,8 \text{ mmol}$) β -Hydroxy- β -methylvaleriansäurebenzhydrylamid in einem Gemisch von 15 ccm 2 n KOH und 15 ccm Methanol 20 Stunden unter Rückfluss auf 100° . Nach dem Abkühlen wurde mit Wasser verdünnt, das auskristallisierte Produkt abfiltriert, mit etwas Wasser gewaschen und im Vak. über P_2O_5 getrocknet: $510,8 \text{ mg}$. Nach Umkristallisation aus Äthanol: Smp. $132 - 135^\circ$. UV-Spektrum (CHCl_3) mit dem Spektrum des Ausgangsmaterials identisch. Im Filtrat liess sich nach Entfernen der K-Ionen mit Dowex $50 (\text{H}^+)$, Ausäthern der sauren, mit NH_4Cl gesättigten Lösung und Einengen des getrockneten Ätherextraktes keine β -Hydroxy- β -methyl-valeriansäure papierelektrophoretisch in Pyridin-Acetat-Puffer ($\text{pH } 6.2$) nachweisen.

11. Infrarot-Spektren

Die vollständigen Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer (Modell 21) unter Verwendung eines NaCl -Prismas von Frl. I. Köhler (MPI für Biochemie, München) aufgenommen. Quantitative Messungen im Bereich der OH-Valenzschwingung ($2,6 - 3,1 \mu$) führten wir mit dem Beckman-Spektrophotometer DK 1 durch (1 cm -Quarzküvetten; Lichtquelle: Wolframlampe; Detektor: Bleisulfidzelle). Vor den Messungen wurden die Nulllinien der verwendeten Lösungsmittel (CHCl_3 und CCl_4) aufgenommen. Sie zeigten im gewünschten Wellenlängenbereich keine Eigenabsorptionen. Um Bandenverschiebungen und andere Änderungen des Spektrums durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auszuschalten, nahmen wir die Spektren bei 0.01 M , 0.005 M und 0.0025 M (oder 0.0033 M) Substanzkonzentration auf. Die Messungen in CHCl_3 liessen sich ohne Schwierigkeiten durchführen, in CCl_4 konnte wegen der schlechten Löslichkeit der Amide nur nach vorhergehender

Inkubation bei 45° in Konzentrationen ≤ 0.005 M gemessen werden. Ein Vergleich der in CHCl_3 und CCl_4 aufgenommenen Spektren des 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydryl-amids (Abb. 17 und 27) zeigt, dass die einzelnen Absorptionsmaxima in CCl_4 deutlicher herauskommen, zum Teil aufgespalten werden, aber gegenüber den Maxima im CHCl_3 -Spektrum kaum verschoben sind. Die IR-spektroskopischen Daten für 5-O-Tetrahydropyranyl- und 5-O-Trityl-mevalonsäurebenzhydryl-amid sind in Tabelle (XVIII) und (XIX) zusammengestellt. Die gefundenen Extinktionskoeffizienten ϵ stellen Maximumswerte dar und bedeuten $(1/c \cdot l) \cdot \log (I_0/I)$ mit l in cm und c in Mol/Liter.

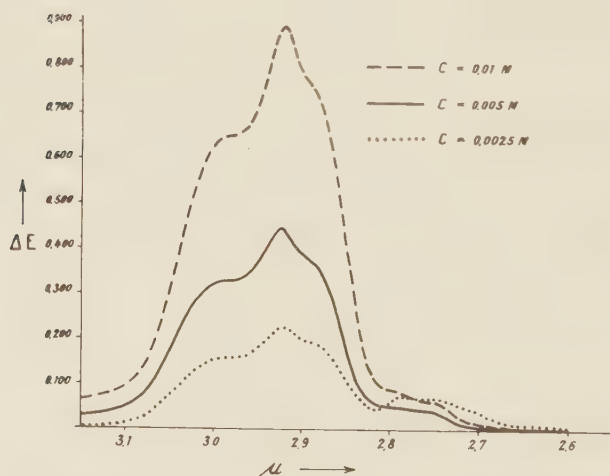


Abb. 27 Absorptionsspektrum von 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydrylamid im OH-Valenzschwingungsbereich (CHCl_3)

Die mit dem Perkin-Elmer-Spektrophotometer aufgenommenen Spektren des S-(β -Hydroxy- β -methylglutaryl)-N-caprylcysteamins zeigen schwach sichtbar die von der OH-Valenzschwingung herrührende Schulter bei $2,88\mu$, die auf den Aufnahmen mit dem Beckman-Spektrophotometer bei der gleichen Wellenlänge viel ausgeprägter erscheint, was für den Wert dieses Apparates für Messungen in der OH-Valenz-Region spricht. In dem als Kristallfilm gemessenen KBr-Spektrum des Cysteamin-Derivates spaltet die $\nu(\text{OH}+\text{NH})$ -Bande in $\nu(\text{OH})$ bei $2,96\mu$ und $\nu(\text{NH})$ bei $3,06\mu$ auf.

Tabelle (XVIII): IR-spektroskopische Daten für 5-O-Tetrahydropyranyl-mevalonsäurebenzhydrylamid

Konz. (CCl_4)	IR-Absorptionsmaxima					
	tert. OH (gebunden)			NH (assoz.)		
	$\lambda (\mu)$	$\tilde{\nu} (\text{cm}^{-1})$	ϵ	λ	$\tilde{\nu}$	ϵ
0.01 M	2,882 (2,91)	3470 (3435)	83 (82)	2,982	3353	62
0.005 M	2,882 (2,91)	3470 (3435)	85 (83)	2,982	3353	61
0.0025 M	2,882 (2,91)	3470 (3435)	85 (83)	2,982	3353	59,2
Konz. (CHCl_3)						
0.01 M	2,92	3425	88,8	~2,98	3355	~64,8
0.005 M	2,92	3425	88,4	~2,98	3355	~65
0.0025 M	2,92	3425	88,8	~2,98	3355	~62

Tabelle (XIX): IR-spektroskopische Daten für 5-O-Trityl-mevalonsäurebenzhydrylamid

	IR-Absorptionsmaxima					
Konz. (CHCl_3)	tert. OH (gebunden)			NH (assoz.)		
	λ	$\bar{\nu}$	ϵ	λ	$\bar{\nu}$	ϵ
0.01 M	2,915	3430	115	abfallende Schulter		
0.005 M	2,915	3430	103			
Konz. (CCl_4)						
0.0025 M	2,88	3475	107	2,975	3360	54

12. Versuch zur Herstellung von Mevalonsäure-dimethylamid

In einem mit Tropftrichter, Rührer und Gasableitungsansatz versehenen 500 ccm-Dreihalskolben wurden 81 g (1 Mol) Dimethylamin-hydrochlorid vorgelegt und das durch Zutropfen von 10 n KOH unter Erwärmen und Rühren entwickelte gasförmige Dimethylamin mittels N_2 durch einen KOH-Trockenturm in eine auf -70° im Aceton- CO_2 -Bad gekühlte Falle geleitet und dort verflüssigt. Das flüssige Dimethylamin gab man zusammen mit 7,6 g (0.058 Mol) Mevalonsäurelacton in einen auf ca. -5° abgekühlten Druckkolben (250 ccm), verschloss ihn und hielt ihn nach vorsichtiger Erwärmung 5 Tage im Thermostaten bei 40° . Anschliessend wurde überschüssiges Dimethylamin durch Erwärmen auf 50° und anschliessende Behandlung am Wasserstrahlvak. (1 Stunde, $40 - 50^\circ$, keine Siedekapillare) vertrieben und das Reaktionsprodukt über konz. H_2SO_4 und KOH

am Ölpumpenvakuum getrocknet. Dabei wurde eine konstante Gewichtsabnahme festgestellt. Hochspannungspapiererelektrophorese im Pyridin-Acetat-Puffer pH 6.2 (auf Whatman 1-Papier; Entwicklung mit Methylrot-Reagens) zeigte einen Säurefleck mit der für Mevalonsäure typischen Laufstrecke.

Es gelang nicht, ein 3,5-O-Benzyliden-Derivat des Reaktionsproduktes nach der für die Herstellung des 3,5-O-Benzyliden-mevalonsäurebenzhydrylamids ausgearbeiteten Methode (Seite 104) zu gewinnen.

13. Hemiacetal (XXXV)

a) Herstellung von $\text{LiAlH}_2(\text{OEt})_2$

2,5 g LiAlH_4 wurden in 250 ccm absol. Äther suspendiert, 30 Min. am Rückfluss gekocht und filtriert. Filtrat: 207 ml. Bestimmung des LiAlH_4 -Gehaltes: 1 ml Ätherlösung versetzte man mit ca. 10 ccm Methanol- H_2O (1:1) und titrierte das gebildete LiOH mit 0,1 n HCl gegen Phenolphthalein. HCl -Verbrauch: 2,3 ml.

Daraus errechnet sich ein LiAlH_4 -Gehalt von 8,71 mg (0,23 mMol)/ml bzw. 1,77 g (0.0466 Mol) pro 203 ml Ätherlösung.

Zu dieser Lösung tropfte man unter Eiskühlung und Rühren ein Gemisch von 4,1 g (0.0466 Mol) Äthylacetat (getrocknet durch Behandlung mit bas. Al_2O_3) und 50 ccm absol. Äther innerhalb 40 Min. und liess die so erhaltene "Reduktionslösung" von $\text{LiAlH}_2(\text{OEt})_2$ über Nacht im Kühlraum gut verschlossen stehen.

b) Reduktion von Mevalonsäurelacton

Zu einer kräftig gerührten Lösung von 5,4 g Mevalonsäurelacton (0.0415 Mol) in 15 ccm abs. Tetrahydrofuran und 50 ccm abs. Äther (250 ccm-Dreihalskolben, versehen mit

Tropftrichter, Rührer und Rückflusskühler) tropften wir bei Raumtemperatur innerhalb 15 Min. die oben beschriebene $\text{LiAlH}_4(\text{OEt})_2$ -Lösung und rührten das Reaktionsgemisch noch 30 Min. bei Raumtemperatur und dann 1 Stunde bei leichtem Rückfluss. Anschliessend gaben wir unter Eiskühlung 30 ccm 2 n H_2SO_4 und 30 ccm H_2O hinzu und trennten nach 30 Min. weiteren Rührens die ätherische Phase von der wässrigen ab. Der Ätherextrakt wurde 4-mal mit H_2O gewaschen, die wässrige Phase auf einer feinporigen Glasfritte abgenutscht und das Gel 3-mal mit H_2O gewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt, mit NaCl gesättigt und über Nacht mit peroxydfreiem Äther perforiert. Die ätherischen Extrakte trockneten wir mit Na_2SO_4 und erhielten nach Abdampfen des Äthers 3,84 g öligen Rückstand, der einer Hochvakuum-Destillation unterworfen wurde. Diese lieferte 2,78 g Hemiacetal (Ausbeute: 51 %), Sdp. 0.06 mm 100-105°.

IR (Film): $\nu(\text{O-H})$ 3,03 μ ; $\nu(\text{C-H aliph.})$ 3,42 μ ;
 $\nu(\text{C-O-CH-O})$ 8,75 ; 9,05 ; 9,33 und 9,9 μ
(Abb. 13)

Mevalonatkinase-Test auf nichtumgesetztes Mevalonat:
negativ.

14. Kinetik der 2,4-Dinitrophenylhydrazonbildung aus Hemiacetal

Die Testlösung enthielt 10 μM Hemiacetal pro ml H_2O .

0,02 ml (0,1 bzw. 0,2 μM) pipettierte man in 0,18 ml M/100 2,4-Dinitrophenylhydrazin (in 2 n HCl) und inkubierte die Proben im Thermostaten bei 50° bzw. 60° C. Zur Zeit t gab man 0,8 ml H_2O und 2,0 ml 66 proz. äthanolische 2 n NaOH hinzu und bestimmte nach 1 Min. $E_{546 \text{ m}\mu}$ im Photometer "Eppendorf". Als Nullwert diente die zur Zeit t_0 ermittelte Extinktion.

Das Ergebnis zeigt Abb. 21. Wie man sieht, besteht nur bei $T = 50^\circ$ bis zu einer Inkubationszeit von 40 Min. gute

Proportionalität, ausserdem scheint ein Temperatureffekt vorzuliegen, der nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch den Extinktionsendwert beeinflusst.

15. Ketalisierungsversuch

1,115 g (8,45 mmol) Hemiacetal wurden mit 11,29 g (182 mmol) Äthylenglykol (dest.) sowie 20 mg p-Toluolsulfonsäure versetzt und 5 Stunden am Hochvakuum (0.05 mm) bei 65 - 70° gehalten, (wobei freiwerdendes H₂O zusammen mit kleinen Mengen Äthylenglykol ständig abdestilliert wird). Anschliessend gab man etwas festes Bikarbonat hinzu und destillierte das Äthylenglykol ab. Nach Zugabe von 8 ccm gesättigter NaHCO₃-Lösung wurde 6-mal mit je 25 ccm Essigester extrahiert. Es resultierten nach Trocknen und Eindampfen 389 mg Öl. Aus der bikarbonathaltigen wässrigen Phase durch 9-stündige Perforation mit Äther noch 830 mg Öl gewonnen. Das IR-Spektrum zeigte nach Destillation der Rückstände unverändertes Ausgangsmaterial.

III. Synthese von Δ^3 -Isopentenol

a) 1-Tetrahydropyranyl-3-butanon

Äquimolare Mengen 3-Ketobutanol ¹⁾ (22 g, 0.25 Mol) und Dihydropyran (21 g) wurden gemischt und unter Eiskühlung mit 2 Tropfen konz. HCl versetzt. Nach dem Stehen über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in 150 ccm peroxydfreiem Äther aufgenommen, mit 0.1 n KHCO₃ und H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde am Vak. destilliert. Sdp._{11 mm} 108 - 109°,

n_D^{26} 1,4479, Ausbeute: 25,8 g (60 % d.Th.)

IR (CHCl₃): Abb. 22

b) Triphenyl-methyl-phosphoniumbromid

In einer Druckflasche wurden 50 g (0,19 Mol) Triphenylphosphin (umkrist. aus Methanol) in abs. Benzol gelöst und bei - 10° mit 25 g (14,5 ccm; 0.265 Mol) Methylbromid versetzt. Man liess das Reaktionsgefäss verschlossen 2 Tage bei Raumtemperatur stehen und isolierte dann das krist. Phosphoniumsalz. Ausbeute: 70,2 g (100 % d.Th.) Smp.: 227 - 229°

c) 1-Tetrahydropyranyl-3-methyl-3-buten

Zu einer Suspension von 14,3 g (40 mMol) Triphenylmethyl-phosphoniumbromid in 150 ccm abs. Äther gab man unter Rühren und N₂-Durchleitung eine etwa 1,36 M ätherische Lösung von Butyl-Lithium (31 ccm; 40 mMol).

¹⁾ Hergestellt durch Kondensation von Aceton und Formaldehyd nach dem Verfahren von T. White und R.N. Haward (59).

Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden in der N_2 -Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Dabei löste sich das Phosphoniumsalz vollständig unter Entstehen einer klaren orangegelben Lösung von Triphenylphosphinmethylen.

Zu der so bereiteten Ylid-Lösung tropfte man 4,25 g (ca. 25 mmol) 1-Tetrahydropyranyl-3-butanon in 70 ccm abs. Äther unter Rühren und N_2 -Durchleitung, wobei augenblicklich das Phosphonium-betain ausfiel. Das Gemisch wurde nun 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann unter gleichzeitiger Zugabe von 270 ccm abs. Tetrahydrofuran der Äther im N_2 -Strom herausdestilliert und das wieder klar gelöste Reaktionsgemisch über Nacht am Rückfluss erhitzt (13 Stunden; $63 - 65^\circ$). Nach dem Abkühlen wurde die weinrote Lösung mit H_2O verdünnt, 5-mal mit Äther extrahiert, der organische Extrakt nacheinander mit 0,2 n H_2SO_4 , n $KHCO_3$ und H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und am Vak. eingeengt. Aus dem öligen Rückstand kristallisierte nach kurzem Stehen bei Raumtemperatur Triphenylphosphinoxid, das in der Kälte abgesaugt und mit kaltem Äther gewaschen wurde. Das Filtrat destillierte man nach Abziehen des Äthers am Vak.

Ausbeute an 1-Tetrahydropyranyl-3-methyl-3-buten:

3,03 g (72 % d.Th.), Sdp._{14 mm} $80 - 85^\circ$

n_D^{26} 1,4412.

IR (Film): $\nu(C=C)$ $6,1\mu$; $\nu(C=CH_2)$ $3,29\mu$

$\nu(C-O-CH-O-C)$ $8,9\mu$; $9,3\mu$; $9,75\mu$; $10,2\mu$

$\delta(C=CH_2)$ $11,23\mu$ (Abb. 22)

d) Δ^3 -Isopentenol

2,75 g (0,0162 Mol) 1-Tetrahydropyran-3-methyl-3-buten versetzte man mit 1,3 ccm 3 n H_2SO_4 in 13 ccm Methanol und liess das Reaktionsgemisch 2 Tage bei Raumtemperatur stehen. Anschliessend wurde mit H_2O verdünnt, die Lösung mit Ammonsulfat gesättigt und 5-mal mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde 2-mal mit 0.1 n NaHCO_3 , 2-mal mit H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Den Rückstand fraktionierte man bei Normaldruck und erhielt ausser einem Vorlauf, der aus Dihydropyran bestand, 0.602 g Δ^3 -Isopentenol (Sdp. 126 - 128°; 43 % d.Th.) und 0.595 g höhersiedenden Rückstand (3-Methylbutandiol-(1,3)).

IR (Film): $\nu(\text{OH})$ 3.05 μ ; $\nu(\text{C}=\text{CH}_2)$ 3,29 μ ;

$\nu(\text{C}=\text{C})$ 6.1 μ ; $\nu(\text{C}-\text{O}, \text{prim. Alkohol})$ 9.55 μ

und $\delta(\text{C}=\text{CH}_2)$ 11.23 μ (Abb. 22)

e) 3,5-Dinitrobenzoat von Δ^3 -Isopentenol

Zu einer Lösung von 413 mg (4,8 mMol) Δ^3 -Isopentenol in 0,5 ccm abs. Benzol und 1,0 ccm abs. Pyridin gaben wir eine heisse Lösung von 1,15 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (5 mMol) in abs. Benzol, verdünnten das Reaktionsgemisch mit 1 ccm Pyridin und liessen es 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Anschliessend kochten wir es mit 70 ccm Äther kurz auf und filtrierten das unlösliche 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid ab. Der Ätherextrakt wurde jeweils 3-mal mit 2 n HCl , 5 proz. Sodalösung und H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Den Rückstand kristallisierte man nach dem Trocknen 3-mal aus Petroläther und 2-mal aus Äthanol um: Smp. (Koflerblock): 55 - 57°. Ausbeute: 503 mg. Papierchromatographie (vgl. [64]):

Das erhaltene 3,5-Dinitrobenzoat wurde zusammen mit einem authentischen 3,5-Dinitrobenzoat des Δ^3 -Isopentenols (Smp. 56 - 57°) (57) im System Methanol/Heptan (1:1) auf Whatman-Papier Nr. 1 (über Nacht aequilibriert) absteigend chromatographiert (Fließmittel: obere Phase = Methanol-gesättigtes Heptan; Kammeratmosphäre mit unterer Phase gesättigt). Nach Trocknen des Papiers Entwicklung: UV-Licht oder Besprühen mit 0,5 proz. α -Naphthylamin-Lösung in Äthanol.

Beide Dinitrobenzoate zeigten $R_F = 0.7$.

Literaturverzeichnis

=====

- (1) Wolf, D.E., C.H. Hoffman, P.E. Aldrich, H.R. Skeggs, L.D. Wright and K. Folkers: J.Amer.Chem.Soc. 78, 4499 (1956)
- (2) Wright, L.D., E.L. Cresson, H.R. Skeggs, G.D.E. MacRae, C.H. Hoffman, D.E. Wolf and K. Folkers: J.Amer.Chem.Soc. 78, 5273 (1956)
- (3) Tavormina, P.A., M.H. Gibbs and J.W. Huff: J.Amer.Chem.Soc. 78, 4498 (1956)
- (4) Ruzicka, L.: Experientia 9, 357 (1953)
- (5) Eschenmoser, A., L. Ruzicka, O. Jeger und D. Arigoni: Helv.chim.Acta 38, 1890 (1955)
- (6) Lynen, F., H. Eggerer, U. Henning und I. Kessel: Angew.Chem. 70, 738 (1958)
- (7) Chaykin, S., J. Law, A.H. Phillips, T.T. Tchen and K. Bloch: Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.) 44, 998 (1958)
- (8) Hoffman, C.H., A.F. Wagner, A.N. Wilson, E. Walton, C.H. Shunk, D.E. Wolf, F.W. Holly and K. Folkers: J.Amer.Chem.Soc. 79, 2316 (1957)
- (9) Arigoni, D.: Privatmitteilung an Herrn Prof. Lynen
- (10) Lynen, F., U. Henning, C. Bublitz, B. Sörbo und L. Kröplin-Rueff: Biochem.Z. 330, 269 (1958)
- (11) Knappe, J., E. Ringelmann und F. Lynen: Biochem.Z. 332, 195 (1959)
- (12) Durr, I.F., and H. Rudney: J.Biol.Chem. 235, 2572 (1960)
- (13) Henning, U., E.M. Mösllein and F. Lynen: Arch.Biochem. Biophys. 83, 259 (1959)
- (14) Lynen, F., B.W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning und E.M. Mösllein: Angew.Chem. 71, 657 (1959)
- (15) Lynen, F., H. Eggerer, U. Henning, J. Knappe, I. Kessel und E. Ringelmann: Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols, London: J. and A.Churchill Ltd. 1959, p.95
- (16) Schlesinger, M.J.: Fed.Proc. 18, 317 (1959)
- (17) Henning, U., I. Kessel und F. Lynen: Intern.Congr.Biochem. 4 th Congr., Vienna 1958, p. 47
- (18) Tchen, T.T., J.Biol.Chem. 233, 1100 (1958)
- (19) Lynen, F., und M. Grassl, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 313, 291 (1958)

- (20) Wittig, G., und U. Schöllkopf: Chem.Ber. 87, 1318 (1954)
- (21) Eggerer, H., und F. Lynen: Liebigs Ann.Chem. 608, 71 (1957)
- (22) Friedemann, T.E., and E.G. Haugen: J.Biol.Chem. 147,
415 (1943)
- (23) Swim, H.E., and L.O. Krampitz: J.Bacteriol. 67, 419 (1954)
- (24) Henning, U.: unveröffentlichte Versuche
- (25) Kunitz, M.: J.Gen.Physiol. 35, 423 (1952)
- (26) Steyn-Parvé, E.P.: Biochim.Biophys.Acta 8, 310 (1952)
- (27) Merckenschlager, M., K. Schlossmann und W. Kurz:
Biochem.Z. 329, 332 (1957)
- (28) Stadtman, E.R., and H.A. Barker: J.Biol.Chem. 184, 769
(1950)
- (29) Kaplan, N.O.: Ciba Foundation Study Group No. 2, Steric
Course of Microbiological Reactions,
London: J. and A.Churchill Ltd. 1959,p.37
- (30) Cornforth, J.W., R.H. Cornforth, A. Pelter, M.G. Horning
and G. Popják: Tetrahedron 5, 311 (1959)
- (31) Grassl, M.: unveröffentlichte Versuche
- (32) Kirschner, K.: unveröffentlichte Versuche
- (33) Wolf, D.E., C.H. Hoffman, P.E. Aldrich, H.R. Skeggs, L.D.
Wright and K. Folkers: J.Amer.Chem.Soc.
79, 1486 (1957)
- (34) Gilham, P.T., and H.G. Khorana: J.Amer.Chem.Soc. 80,
6212 (1958)
- (35) Bender, M.L., R.D. Ginger and K.C. Kemp: J.Amer.Chem.Soc.
76, 3350 (1954)
- (36) Bender, M.L., and R.D. Ginger: J.Amer.Chem.Soc. 77, 348
(1955)
- (37) Huisgen, R., und H. Ott: Tetrahedron 6, 253 (1959)
- (38) Barton, D.H.R., and R.C. Cookson: Quart.Rev. 10, 44 (1956)
- (39) Zürn, L.: Liebigs Ann.Chem. 631, 56 (1960)
- (40) Zahn, H., und L. Zürn: Liebigs Ann.Chem. 613, 76 (1958)
- (41) Barker, S.A., J.S. Brimacombe, A.B. Foster, D.H. Whiffen
and G. Zweifel: Tetrahedron 7, 10 (1959)
- (42) Anet, F.A.L., and P.M.G. Bavin: Canad.J.Chem. 34, 1756
(1956)
- (43) Jones, R.N., P. Humphries, F. Herling and K. Dobriner:
J.Amer.Chem.Soc. 74, 2820 (1952)
- (44) Cole, A.R.H., and P.R. Jefferies: J.Chem.Soc. 1956, 4391

- (45) Bellamy, L.J.: "The Infrared Spectra of Complex Molecules",
London: Methuen 1957, p. 104
- (46) Bergmann, E.D., and S. Pinchas: Rec.trav.chim. 71, 161
(1952)
- (47) Brimacombe, J.S., A.B. Foster and M. Stacey: Chemistry
and Industry 1958, 1228
- (48) Lynen, F.: J.Cell.and Comp. Physiol., 54, Suppl. 1, 33
(1959)
- (49) Vennesland, B., and F.H. Westheimer: The Mechanism of
Enzyme Action, Baltimore: Johns Hopkins
Press 1954, p. 357
- (50) Buchanan, J.M., and S.C. Hartman, in Advances in Enzymology,
Vol. XXI, Interscience, New York, 1959,
p. 229
- (51) Kon, G.A.R. and R.P. Linstead: J.Chem.Soc. 127, 616 (1925)
- (52) Sheehan, J.C., M. Goodman and G.P. Hess: J.Amer.Chem.Soc.
78, 1367 (1956)
- (53) Khorana, H.G.: Chemistry and Industry 1955, 1087
- (54) Gaylord, N.G.: Reduction with Complex Metal Hydrides",
Interscience, New York 1956, p. 510
- (55) Brown, H.C., and A. Tsukamoto: J.Amer.Chem.Soc. 81, 502
(1959)
- (56) von Ew, J., R. Neher und T. Reichstein: Helv.chim.Acta
38, 1423 (1955)
- (57) Eggerer, H., und F. Lynen: Liebigs Ann.Chem. 630, 58 (1960)
- (58) Bloch, K., S. Chaykin, A.H. Phillips, A. DeWaard:
J.Biol.Chem. 234, 2595 (1959)
- (59) White, T., and R.N. Haward: J.Chem.Soc. 1943, 25
- (60) Sondheimer, F., and R. Mechoulam: J.Amer.Chem.Soc. 79,
5029 (1957)
- (61) Bergmann, W., and J.P. Dusza: Liebigs Ann.Chem. 598, 93
(1956)
- (62) Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H.
Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer:
Z.Naturforsch. 8b, 555 (1953)
- (63) Ott, A.C., M.F. Murray, R.L. Pederson: J.Amer.Chem.Soc.
74, 1239 (1952)
- (64) Meigh, D.F.: Nature 169, 706 (1952)
- (65) Potter, V.R., and H. Niemeyer: Ciba Foundation Symposium
on Regulation of Cell Metabolism, London:
J. and A.Churchill Ltd. 1959, p. 230

Lebenslauf

Am 31. Oktober 1932 wurde ich in Essen als Sohn des Bergwerksdirektors Hans Dütting und seiner Ehefrau Liselotte geborene Frein von der Goltz geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1945 in das Humanistische Gymnasium der Stadt Gelsenkirchen ein, blieb dort bis Dezember 1951 und schloss meine Schulzeit am Staatl. Gymnasium und Realgymnasium in Bad Hersfeld im Frühjahr 1953 mit der Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1953 begann ich mein Chemie-Studium an der Universität Zürich und setzte dieses nach einem Probe-semester als Gasthörer im Wintersemester 1954 an der Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule fort. Im Mai 1955 und 1956 legte ich dort die 1. und 2. Vordiplomprüfung, im Mai 1957 die Schlussdiplomprüfung ab. Die Diplomarbeit führte ich im organisch-chemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. V. Prelog aus. Seit September 1957 arbeitete ich am Max Planck-Institut für Zellchemie in München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen an der vorliegenden Promotionsarbeit.

